

DIE WIRKUNG VON Ca^{**} UND VON ZYKLISCHEN UND NICHTZYKLISCHEN NUKLEOTIDEN AUF DIE STIMULIERUNG VON LYMPHOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von Artur Ulmer, Lüneburg

Berlin, 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

DIE WIRKUNG VON Ca^{**} UND VON ZYKLISCHEN UND NICHTZYKLISCHEN NUKLEOTIDEN AUF DIE STIMULIERUNG VON LYMPHOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von Artur Ulmer, Lüneburg

Berlin, 1976



1. Referent: Prof. Dr. T. Diamantstein

2. Referent: Prof. Dr. K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung: 28. September 1976

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Betreuung von Prof. Dr. T. Diamantstein am Immunologischen Forschungslabor des Klinikums Steglitz durchgeführt.

Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, die zahllosen Anregungen und ständige Förderung und sein unerschöpflicher Rat waren mir eine wertvolle Hilfe, die mich zu großem Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	10
2.1. Tiere.....	10
2.2. Chemikalien und Medien.....	10
2.3. Herstellung der Zellsuspensionen.....	11
2.3.1. Milz-, Thymus-, und Lymphknoten-Zellsuspension..	11
2.3.2. Knochenmark-Zellsuspension.....	11
2.3.3. Peritoneal-Zellsuspension.....	11
2.4. Viabilitätstest.....	12
2.5. Differentialzählung der Zahlen.....	12
2.6. Techniken zur Zellseparierung.....	12
2.6.1. Glasperlen-Säule.....	12
2.6.2. Nylonwolle-Säule.....	14
2.6.3. Trennung der Zellen mit Hilfe von LSR.....	14
2.7. Zellkulturen.....	16
2.7.1. Bestimmung des Thymidineinbaus.....	16
2.7.1.1. Bestimmung des (³ H)TdR-Einbaus in Makrokulturen.	17
2.7.1.2. Bestimmung des (³ H)TdR-Einbaus in Mikrokulturen.	17
2.7.2. Bestimmung der Lymphozytentransformation.....	18
2.7.3. Bestimmung der Colcemid-Metaphasen.....	19
2.7.4. Gewinnung von LAF und LIF.....	19
2.7.5. Bestimmung der LAF- und LIF-Aktivität.....	20
3. Ergebnisse.....	21
3.1. Die Kontrolle der mitogenen Stimulierung in vitro durch Ca ⁺⁺	21
3.1.1. Die Hemmung der mitogenen Stimulierung durch EGTA und deren Aufhebung durch Ca ⁺⁺	21
3.1.2. Die Ca ⁺⁺ -abhängige Periode der mitogenen Stimulierung.....	21
3.2. Die Regulierung der Proliferation von Lympho- zyten durch zyklische und nichtzyklische Nukleotide.....	23
3.2.1. Die Wirkung von 3',5'-cGMP und 3',5'-cAMP auf die DNA-Synthese in nichtstimulierten und mitogen stimulierten Lymphozyten der Maus.....	23

3.2.2.	Die Wirkung verschiedener zyklischer und nicht zyklischer Nukleotide auf die DNA-Synthese in nicht stimulierten und mit LPS stimulierten Zellen.....	28
3.2.3.	Die Aktivierung von Lymphozyten in Gegenwart von Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von zyklischen Nukleotiden verändern.....	31
3.2.4.	Der zeitliche Verlauf der DNA-Synthese von Lymphozyten nach Stimulierung mit 3',5'-cGMP, 2',3'-cGMP und GDP.....	34
3.2.5.	Die Stimulierung der DNA-Synthese in Lymphozyten verschiedenen Ursprungs durch GDP und 2',3'-cGMP.....	35
3.2.6.	Die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP und von EGTA auf die Stimulation von BALB/c Milzzellen durch 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP.....	37
3.2.7.	Stimulierung der Blastzellstransformation, Proliferation und des Thymidineinbaus in durch TCA fällbares Material.....	39
3.2.8.	Die antagonistische Wirkung von 3',5'-cGMP und von GDP auf die durch 3',5'-cAMP verursachte Hemmung der mitogenen Stimulation.....	41
3.2.9.	Die Kinetik der Hemmung durch 3',5'-cAMP und der dazu antagonistischen Wirkung von 3',5'-cGMP.....	44
3.2.10.	Die Spezifität der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP.....	46
3.2.11.	Die makrophagenabhängige Stimulierung der Lymphozyten durch 3',5'-cGMP und GDP.....	47
3.3.	Die Stimulierung der Produktion von löslichen Faktoren (LAF und LIF) in PZ-Kulturen.....	51
3.3.1.	Der Effekt von SUP aus PZ-Kulturen auf die DNA-Synthese in Thymuszellen.....	51
3.3.2.	Verschiedene Bedingungen für die Sekretion von LAF und für die Bestimmung der LAF-Aktivität.....	52
3.3.3.	Die Wirkung verschiedener Dosen von dialysiertem und undialysiertem SUP von PZ-Kulturen auf mit PHA stimulierte und unstimulierte Thymuszellen...	54
3.3.4.	Die hemmende Wirkung von LIF auf die mitogene Stimulierung von Thymus- und Milzzellen.....	58
3.3.5.	Die Kinetik der LAF-Sekretion.....	59
3.3.6.	Der Einfluß von LAF und LIF auf die Proliferation von Lymphozyten.....	60
3.3.7.	Die zelluläre Herkunft von LAF.....	60
3.3.8.	Die Wirkung verschiedener Hemmer von Zellfunktionen auf die 3',5'-cGMP-abhängige LAF-Produktion.....	63

	Seite
3.3.9. Das Fehlen aktivierender Eigenschaften des SUP von lysierten PZ.....	65
3.3.10. Die Hemmung der Wirkung von LAF durch EGTA und 3',5'-cAMP.....	66
3.3.11. Die Stimulierung der DNA-Synthese in Milz- und Thymuszellen der Maus durch A23187.....	66
3.3.12. Die erhöhte LAF-Produktion nach Stimulation von PZ mit A23187.....	68
3.3.13 Die Wirkung von Inhibitoren der Protein- bzw. mRNA-Synthese und von 3',5'-cAMP auf die Stimulierung der LAF-Produktion durch A23187 in PZ-Kulturen.....	69
3.3.14. Die Ca^{++} -unabhängige Wirkung des Ca-Ionophores A23187 auf die LAF-Produktion.....	69
3.3.15. Die unterschiedliche Wirkung von 3',5'-cGMP, A23187 und LAF auf die Lymphozytenstimulation....	70
4. Diskussion.....	73
4.1. Die Rolle von Ca^{++} bei der Aktivierung von Lymphozyten.....	73
4.2. Die Wirkung von zyklischen und nicht-zyklischen Nukleotiden auf die Aktivierung von Lymphozyten..	76
4.3. Die Produktion von löslichen Faktoren in PZ-Kulturen.....	86
5. Zusammenfassung.....	91
6. Abkürzungen.....	93
7. Literaturverzeichnis.....	94

1. EINLEITUNG

Die unstimulierten Lymphozyten erscheinen im Lichtmikroskop morphologisch einheitlich. Sie sind hinsichtlich ihrer Entwicklungsgeschichte und ihrer Funktion jedoch keine homogene Zellpopulation. Man unterscheidet heute zwei Hauptgruppen: a) B-Lymphozyten leiten sich von Stammzellen im Knochenmark ab. Sie reifen bei Vögeln in der Bursa Fabricii, bei Säugern an einem bis jetzt noch unbekannten Ort zu den B-Zellen heran (es sind allerdings unter anderem die Peyerschen Plaques im Dünndarm in Erwägung gezogen worden) und wandern in die peripheren lymphatischen Gewebe der Lymphknoten, Milz u.a.. Diese Zellen sind die Vorläufer der antikörperbildenden Lymphozyten.

Nach Stimulierung mit einem Antigen werden die B-Lymphozyten nach Teilung und Differenzierung zu antikörperbildenden- und sezernierenden Zellen. Einige allerdings differenzieren sich zu 'Gedächtniszellen', die bei einem zweiten Antigenkontakt in der sogenannten 'sekundären Antwort' eine wesentlich schnellere, quantitativ und qualitativ andere Antwort zeigen als die jungfräulichen B-Lymphozyten in der sogenannten 'primären' Antwort.

b) T-Lymphozyten leiten sich ebenfalls von Stammzellen im Knochenmark ab. Sie wandern in den Thymus und reifen dort zu den immunkompetenten T-Zellen, die später in den peripheren lymphatischen Geweben zu finden sind.

T-Lymphozyten vermitteln die zellulären immunologischen Reaktionen. Nach Stimulierung mit einem Antigen differenzieren und teilen sie sich und werden zu den Zellen, die an der Abstoßung von Transplantaten beteiligt sind, die lösliche Faktoren, die sogenannten Lymphokine sezernieren und die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion vermitteln. Ähnlich wie bei der humoralen Immunantwort findet man auch hier bei einem zweiten antigenen Kontakt der T-Zellen eine Sekundärantwort.

Des weiteren können T-Lymphozyten als "Helfer"- oder "Suppressor"-Zellen an der Regulierung der humoralen und zellulären Immunantwort beteiligt sein. Sie sezernieren aber selbst keine Antikörper.

Neben diesen beiden Lymphozytenpopulationen sind auch die Makrophagen am Immungeschehen beteiligt. Sie sind notwendig für die Stimulierung der Antikörpersynthese in vitro, bei der Kooperation von B- und T-Lymphozyten und bei der Bildung von zytotoxischen Zellen. Die Rolle, die die Makrophagen im Einzelnen bei diesen Prozessen haben, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Bevor der Lymphozyt stimuliert worden ist, ist er eine kleine Zelle mit geringem Stoffwechsel, die sich nicht teilt. Die Zelle ist in der sogenannten Ruhe- oder G_0 -Phase arretiert.

Die natürlichen Stimulatoren der Lymphozyten sind die Antigene. Die Stimulation wird durch die Bindung des Antigens an einen spezifischen Oberflächenrezeptor auf der Zellmembran ausgelöst. Entsprechend der klonalen Selektionstheorie (BURNET 1959) besitzt jeder Lymphozyt nur Rezeptoren einer bestimmten Spezifität. B-Lymphozyten antworten auf einen antigenen Reiz mit der Produktion von Antikörpern, die die gleiche Spezifität wie die Rezeptoren haben. Es hat sich herausgestellt, daß die Rezeptoren von B-Lymphozyten Immunglobuline sind, während die Natur der T-Zell-Rezeptoren noch ungeklärt ist.

Wegen der Mannigfaltigkeit der Spezifitäten existiert immer nur eine beschränkte Zahl von B- oder T-Lymphozyten mit gleicher oder ähnlicher Spezifität oder Rezeptoren. Daraus ergibt sich, daß immer nur wenige Zellen auf ein bestimmtes Antigen antworten. Diese Tatsache macht Untersuchungen über die molekularen Veränderungen, die nach einer antigenen Stimulierung von Lymphozyten erfolgen, praktisch unmöglich. Durch die Verwendung sogenannter Mitogene zur Aktivierung dieser Zellen werden diese Schwierigkeiten umgangen. Die mitogene Stimulierung ist als ein Modell der antigenen Stimulierung anerkannt.

Zunächst hatten HUNGERFORD et al. 1959 und NOWEL 1960 entdeckt, daß Phytohemagglutinin (PHA), ein Proteinextrakt aus Phaseolus vulgaris, Leukozyten aktiviert. Im Gegensatz zu einem Antigen stimuliert dieses Mitogen eine große Zahl ruhender Zellen. Man weiß inzwischen, daß die Wirkung jedoch nur auf T-Lymphozyten beschränkt ist.

Neben PHA sind seit dem noch andere Mitogene gefunden worden. Die gebräuchlichsten sind Concanavalin A (Con A), ein Extrakt aus der Bohne Canavalia ensiferiformis, der ebenfalls T-Zellen stimuliert, Pockweed Mitogen (PWM), ein Extrakt aus Phytolucca americana, der T- und B-Zellen stimuliert; Lipopolysaccharid (LPS) aus der Membran von Bakterien und Dextransulfat (DS) stimulieren dagegen beide nur B-Zellen.

Die Stimulierung der Lymphozyten durch Mitogene wird "nicht spezifisch" genannt, da die Mitogene im Gegensatz zu den Antigenen mit relativ unspezifischen Oberflächenbestandteilen der Membran von Zellen einer bestimmten Zellpopulation reagieren und nicht mit Rezeptoren der hochspezifischen Immunglobuline eines bestimmten Lymphozyten. Trotzdem zeigen die Mitogene in der Stimulierbarkeit von T- und B-Zellen gewisse Spezifitäten: PHA und Con A stimulieren verschiedene Subpopulationen von T-Lymphozyten (STOBO 1973), LPS und DS verschiedene Subpopulationen von B-Lymphozyten (DIAMANTSTEIN et al. 1974, GRONOWICZ et al. 1974).

Die Bindung eines Mitogens an den entsprechenden Rezeptor eines für die Stimulierung geeigneten Lymphozyten scheint hinreichend für die Stimulierung zu sein,

da eine Endozytose für die Aktivierung nicht notwendig ist (ANDERSON et al. 1972, GREAVES & BAUMINGER 1972, LINDAHL-KIESLING & MATTSON 1971).

Nach der Bindung eines Mitogens an einen geeigneten Lymphozyten werden zahlreiche physiologische und morphologische Veränderungen der Zelle beobachtet, die letztendlich zur Differenzierung und Teilung des bis dahin ruhenden Lymphozyten führen. Bereits fünf Minuten nach Stimulierung mit einem Lektin ist eine Veränderung der Membranfluidität feststellbar (BARNET et al. 1974). Man vermutet, daß die erniedrigte Viskosität der Membran durch Veränderung der Zusammensetzung der Phospholipide der Membran verursacht wird. So wurde eine Erhöhung des ^{32}P - und des Azetateinbaus in den Phospholipiden der Membran nach mitogener Stimulierung von Lymphozyten gefunden (BETEL & VAN DEN BERG 1974, FISHER & MUELLER 1969, LUCAS et al. 1971, MAINO et al. 1975, MASUZAWA et al. 1973). Ebenso wurde ein erhöhter Umsatz der Fettsäuren der Phospholipide festgestellt, bei der der Einbau von langkettigen ungesättigten Fettsäuren in die β -Position der Phospholipide bevorzugt wird (RESCH im Druck).

Eines der frühesten Ereignisse nach mitogener Stimulierung ist eine erhöhte K^+ -Aufnahme (AVERDUNK & LAUF 1975, POMMIER et al. 1975, QUASTEL & KAPLAN 1970). Dieser K^+ -Influx wird begleitet von einem erhöhten Na^+ -Efflux und einer Erhöhung der Quabain-Bindungsstellen der ATP'asen (AVERDUNK & LAUF 1975). Neben diesem Kationeninflux und -efflux sind Veränderungen des Transportes von weiteren Stoffen in die Zelle gefunden worden. Es sind dies eine mitogene Aktivierung des Zuckertransportes (PETERS & HAUSEN 1971b), des Aminosäuretransportes (MENDELSON et al. 1971, VAN DEN BERG & BETEL 1973), des Thymidintransportes (BARLOW & ORD 1975) und auch der Uridinaufnahme (PETERS & HAUSEN 1971a, BETEL & VAN DEN BERG 1974).

Neben diesen molekularen und funktionellen Veränderungen, die die Zellmembran betreffen, sind intrazelluläre Veränderungen beschrieben worden.

Mit zu den frühesten Ereignissen in stimulierten Lymphozyten gehören Veränderungen der Kernproteine. Es sind dies eine Acetylierung der Histone (POGO et al. 1966), eine erhöhte Phosphorylierung der Kernproteine (KLEINSMITH et al. 1966), eine erhöhte Bindung von Acridinorange und Actinomycin D (DARZYŃKIEWICZ et al. 1969) und eine erhöhte Kernproteinsynthese (HEMINSKI 1975, JOHNSON et al. 1974, ROSENBERG & LEVY 1972). Es wird vermutet, daß diese Vorgänge im Zusammenhang mit einer Genaktivierung (ALLFREY 1970) stehen.

Die frühe Stimulierung der Proteinsynthese geht parallel mit einem linearen Anstieg des prozentualen Anteils von aktiven Ribosomen (AHERN & KAY 1975). Die Energie für die mitogene Aktivierung der Lymphozyten wird durch eine erhöhte

Glycolyse und eine erhöhte Krebs-Zyklus-Aktivität geliefert (ROOS & LOOS 1970).

Alle diese Veränderungen kulminieren in der DNA-Synthese und der Proliferation des durch ein Mitogen aktivierten Lymphozyten. In mitogen stimulierten Lymphozytenkulturen beginnt die DNA-Synthese 24 h nach Kulturbeginn und erreicht ein Maximum nach 48 bis 72 h. Unter normalen Kulturbedingungen teilt sich jede Zelle ungefähr fünf mal und stirbt dann ab (HIRSCHHER & HIRSCHHORN 1974).

Neben diesen physiologischen Veränderungen der Lymphozyten sind auch morphologische Veränderungen zu beobachten. Der unstimulierte kleine Lymphozyt hat um den Kern nur einen schmalen Zytoplasmasaum. Der Kern hat ein dichtes Chromatin ohne Nukleolus. Schon 24 h nach Aktivierung mit einem Mitogen findet man in Lymphozytenkulturen Plasmazellen und/oder Lymphoblasten. Diese stimulierten Zellen haben an Größe zugenommen und besitzen ein vergrößertes Zytoplasma. Das Chromatin des Kerns hat sich aufgelockert, und es sind ein oder zwei Nukleoli zu sehen. Die Anzahl der Lysosomen und freien Ribosomen hat zugenommen, und in der Antikörper sezernierenden Plasmazelle ist elektronenmikroskopisch ein gut entwickeltes Endoplasmatisches Retikulum zu sehen. 48 bis 72 h nach Stimulierung werden viele Zellen in Teilung gefunden.

Die Aktivierung eines Lymphozyten durch ein Mitogen wird durch die Bindung des Mitogens mit einem entsprechenden Rezeptor der Plasmamembran vermittelt. Daraus ergibt sich die Frage nach einem möglichen Vermittler, der nach der Bindung des Mitogens an den Rezeptor die zum Teil oben beschriebenen Veränderungen des stimulierten Lymphozyten auslöst.

Bei der Kontraktion des Skelettmuskels und wahrscheinlich bei der Stimulierung einiger sekretorischer Systeme dient Ca^{++} als ein solches Signal, indem eine erhöhte Permeabilität von Membranen für das Passieren dieses Kations in Richtung des Konzentrationsgradienten die Ca^{++} -Konzentration im Zytoplasma vergrößert (HEILBRUN & WIERCINSKI 1947, RUBIN 1970). Inzwischen ist nun mehrfach angenommen worden, daß Ca^{++} das die Zellmembran passierende übermittelnde Signal der Mitogen-Rezeptor-Bindung für die Aktivierung der Lymphozyten sei (FREEDMAN et al. 1975, LUCKASEN et al. 1974, MAINO et al. 1974). Für diese Vermutungen sprechen eine Reihe von Untersuchungen:

Die mitogene Stimulierung von Lymphozyten durch PHA ist von exogenem Ca^{++} abhängig, wie unter anderem mit Hilfe von Chelatkomplex-Bildern wie EDTA und EGTA gefunden worden ist (ALFORD 1970, KAY 1971, WHITNEY & SUTHERLAND 1972 a). EGTA hat im Gegensatz zu EDTA eine um 10^5 mal höhere Affinität für Ca^{++} wie für Mg^{++} (CALDWELL 1970).

EDTA und EGTA verhindern aber nicht die Bindung von Lectinen an Lymphozyten (RESCH et al. 1975, WHITNEY & SUTHERLAND 1973), so daß erst die Aktivierung von Lymphozyten nach der Bindung des Mitogens Ca^{++} -abhängig sein kann. Zum Anderen inhibieren die Chelatbildner die mitogene Stimulierung, auch wenn sie erst nach dem Mitogen den Lymphozytenkulturen zugegeben werden (WHITNEY & SUTHERLAND 1972 a). Es wird aber von diesen Autoren vermutet, daß extrazelluläres Ca^{++} nur während einer frühen Phase der Lymphozytentransformation notwendig ist, da die mitogene Stimulierung nur inhibiert werden kann, wenn EGTA während der ersten Stunden der Kulturzeit anwesend ist.

PHA, Con A und PWM erhöhen in Lymphozyten die Aufnahme von exogenem Ca^{++} (ALLWOOD et al. 1971, FREEDMAN et al. 1975, WHITNEY & SUTHERLAND 1972 b).

PARKER 1974 hat neben vier verschiedenen Klassen von Mitogenen dazu verwandte, nicht-mitogene Substanzen getestet und eine strenge Korrelation zwischen Mitogenität und Ca^{++} -Aufnahme festgestellt.

WHITNEY & SUTHERLAND 1973 b fanden, daß sich diese Ca^{++} -Aufnahme als ein passiver Transport durch erleichterte Diffusion vollzieht.

Das stärkste Argument für eine Signalfunktion der Ca^{++} -Aufnahme durch Lymphozyten bei der mitogenen Stimulierung stammt aus Untersuchungen von MAINO et al. 1974 und von LUCKASEN et al. 1974. Sie fanden, daß das Ca^{++} -Ionophore A 23187 Blasttransformation, DNA-Synthese und Proliferation von Lymphozyten des Schweines bzw. von Humanlymphozyten induziert. A 23187 ist ein Antibiotikum, das mit höherer Affinität für Kalzium divalente Kationen durch biologische Membranen transportiert (REED & LARDY 1972). Inzwischen wurde gezeigt, daß A 23187 die Ca^{++} -Aufnahme auch von Lymphozyten erhöht (NEELY et al. 1975).

Alle diese Untersuchungen scheinen dafür zu sprechen, daß das Öffnen von Ca^{++} -Kanälen eine hinreichende Bedingung für die Induktion der Aktivierung von Lymphozyten ist und Ca^{++} als "second messenger" wirkt, der das Signal der Bindung des Mitogens an seinen Rezeptor an die intrazelluläre Reaktion vermittelt, die dann zur Differenzierung und Teilung der Zelle führt.

Auf der anderen Seite existieren aber widersprüchliche Ergebnisse zu dieser These. Wenn die erhöhte Ca^{++} -Aufnahme ein allgemeingültiges Signal für die Aktivierung von Lymphozyten sein soll, muß dies sowohl für die mitogene Stimulierung von B- und von T-Lymphozyten wie auch für die antigene Stimulierung gelten. Es ist sicher, daß T-Zell-Mitogene den Ca^{++} -Influx nur in T-Lymphozyten erhöhen (FREEDMANN et al. 1975). Von diesen Autoren konnte jedoch keine Aktivierung der Ca^{++} -Aufnahme in B-Lymphozyten durch LPS, ein B-Zell-Mitogen, festgestellt werden. DIAMANTS TEIN & ODENWALD 1974 stellten fest, daß die ersten 24 h der latenten

Phase der antigenen Stimulierung in vitro bei der Primärantwort von Lymphozyten Ca^{++} -unabhängig ist. Diese Untersuchungen sprechen zumindest gegen die Allgemeingültigkeit der angenommenen Signalwirkung der Ca^{++} -Aufnahme.

Durch die Ergebnisse von DIAMANTSTEIN & ODENWALD 1974 angeregt, sollten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

a) WHITNEY & SUTHERLAND 1972 a nahmen an, daß Ca^{++} nur während der frühen Phase der antigenen Stimulierung notwendig ist. Dies steht im Gegensatz zu den oben berichteten Ergebnissen von DIAMANTSTEIN & ODENWALD. Wir wollten deshalb untersuchen, ob diese Diskrepanz von den unterschiedlichen Stimulantien (Antigen bzw. Mitogen) herzuleiten ist.

b) Bisher war nur die Ca^{++} -Abhängigkeit der mitogenen Stimulierung von T-Lymphozyten durch PHA untersucht worden. Da bisher die Allgemeingültigkeit dieses Befunds für die Induktion der Proliferation von Lymphozyten noch nicht gezeigt wurde, schien es uns notwendig, die Ca^{++} -Abhängigkeit der Stimulierung dieser Zellen durch weitere T-Zell-Mitogene und besonders auch durch B-Zell-Mitogene zu untersuchen.

c) Wenn die Ursache der Wirkung des Ca^{++} -Ionophores A 23187 auf die Lymphozyten wirklich auf der Erhöhung des Ca^{++} -Influges beruht und dieses Signal allgemeine Gültigkeit für die Aktivierung von Lymphozyten hat, müßte das Ionophore seine Wirkung ohne weitere "Helfer"-Zellen auf Lymphozyten ausüben können. Wir untersuchten deswegen die Wirkung des Ionophores auf Zellpopulationen, in denen neben Lymphozyten nur eine sehr geringe Anzahl von weiteren Zellarten vorhanden war.

Das Konzept der Wirkung von zahlreichen Hormonen bei der Stimulierung von gewebsspezifischen Enzymen über 3',5'-cAMP als "second messenger" ist allgemein anerkannt (ROBISON et al. 1971). Es besagt, daß ein Hormon an einen spezifischen Rezeptor der Zellmembran bindet. Diese Bindung aktiviert die Adenylzyklase, mit der der Rezeptor verbunden ist, und katalysiert die Bildung von 3',5'-cAMP aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat. Abgebaut wird 3',5'-cAMP mit Hilfe der Phosphodiesterase, die durch Lösen einer der Esterbindungen des Phosphats 3',5'-cAMP in 5'-AMP überführt. So kann die Konzentration des 3',5'-cAMP durch die Aktivität der synthetisierenden Zyklastase und der abbauenden Esterase reguliert werden. 3',5'-cAMP löst dann die Reaktionen aus, die zu der "vorprogrammierten" spezifischen physiologischen Antwort der Zelle führt. Diese Reaktionen werden durch einen Einfluß von 3',5'-cAMP auf die Aktivität von Enzymen ausgelöst. Neben anderen scheint die Aktivierung einer Proteinkinase durch 3',5'-cAMP bei der Reaktionskette, die zu der spezifischen Antwort führt, eine Rolle zu spielen (ROBISON et al. 1971).

E.W. SUTHERLAND stellte vier Kriterien auf (ROBISON et al. 1971), die für die Annahme der These, daß ein bestimmtes Hormon seine Wirkung über diese das 3',5'-cAMP einschließende Reaktionskette ausübt, erfüllt sein müssen:

1. Das Hormon soll fähig sein, die Adenylzyklase in aufgebrochenen Zellpopulationen zu stimulieren.
2. Das Hormon soll fähig sein, die intrazelluläre Konzentration von 3',5'-cAMP in intakten Zellen dosisabhängig zu erhöhen.
3. Es soll möglich sein, die Wirkung des Hormons durch Theophyllin oder einen anderen Phosphodiesterasehemmer zu potenzieren.
4. Die physiologische Wirkung des Hormons soll durch exogenes 3',5'-cAMP allein ausgelöst werden können.

Obwohl 3',5'-cGMP in den meisten Geweben in wesentlich geringerer Konzentration als 3',5'-cAMP vorkommt, wird diesem zyklischen Nukleotid inzwischen ebenfalls eine Funktion als "second messenger" zugesprochen (GOLDBERG et al. 1973).

3',5'-cGMP wird durch eine von der Guanylylzyklase katalysierten Reaktion aus GTP gebildet.

Aus der Tatsache, daß in zahlreichen verschiedenen Experimenten 3',5'-cGMP an zellulären Reaktionen beteiligt ist, die antagonistisch zu denen sind, an denen 3',5'-cAMP beteiligt ist, entwickelte GOLDBERG seine "Dualism"- oder "Yin-yang"-Hypothese der Kontrolle von biologischen Systemen durch zyklischen Nukleotide (GOLDBERG et al. 1974). Diese Hypothese bezieht sich auf Systeme, die auf Grund der entgegengesetzten Wirkung der beiden zyklischen Nukleotide reguliert werden. Entsprechend diesem Konzept wird ein aktivierender Einfluß durch die intrazelluläre Konzentration von 3',5'-cAMP ausgelöst, während der entgegengesetzte inhibierende Einfluß durch 3',5'-cGMP ausgelöst wird bzw. vice versa. Die tatsächliche Antwort der Zelle hängt demnach letztendlich von dem Verhältnis der Konzentrationen von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP ab.

Bei der mitogenen bzw. antigenen Stimulierung von Lymphozyten löst die Bindung eines Mitogens oder Antigens an Oberflächenrezeptoren der Zellmembran die spezifische Antwort der Zelle aus (Differenzierung, Proliferation, Produktion von spezifischen Antikörpern). Diese Reaktionsfolge scheint homolog zu der oben beschriebenen hormonellen Stimulierung von Zellen zu sein. Es war deswegen von Interesse zu untersuchen, inwieweit zyklische Nukleotide im immunologischen Zellsystem ebenfalls eine Rolle als "second messenger" spielen.

Nach der Stimulierung von Humanlymphozyten durch PHA oder Con A hat sich nach 20 min. die intrazelluläre Konzentration von 3',5'-cGMP bis auf das 50-fache erhöht. Das Niveau von 3',5'-cAMP zeigt dagegen nur ganz geringe Veränderungen

(HADDEN et al. 1972). Ähnliche Resultate fand WATSON 1975 bei der Stimulierung von B-Lymphozyten der Maus mit LPS. Bei Thymuszellen von Ratten fanden WHITFIELD et al. 1974 nach Stimulierung mit Con A eine Ca^{++} -abhängige Erhöhung der Konzentration von 3',5'-cGMP und eine Ca^{++} -unabhängige Erhöhung des 3',5'-cAMP-Niveaus.

Des weiteren wurde gefunden, daß ca. 10 min. nach einer antigenen Stimulierung in vivo mit SRBC die Konzentration von 3',5'-cGMP in der Milz der Maus steigt und bis sieben Tage danach über dem Kontrollwert bleibt. 3',5'-cAMP dagegen zeigt einen Peak in der Erhöhung der Konzentration zwei Minuten nach der antigenen Stimulierung und sinkt dann schnell unter den Kontrollwert (YAMAMOTO & WEBB 1975).

Andere Gruppen dagegen fanden nach mitogener Stimulierung von humanen Blutlymphozyten nur eine Erhöhung der 3',5'-cAMP-Konzentration ohne eine Änderung des Gehalts von 3',5'-cGMP (KRISHNARAJ & TALWAR 1973, SMITH et al. 1971 a).

Über die Wirkung von Mitogenen auf die Adenylzyklase liegen eine Reihe ebenfalls widersprüchlicher Ergebnisse vor. So fanden KRISHNARAJ & TALWAR 1973 und SMITH et al. 1970 bei humanen Blutlymphozyten und WINCHURCH et al. 1971 bei Milzzellen der Maus eine Stimulierung der Adenylzyklase durch PHA, während DERUBERTIS 1974 in Präparationen aus Milzzellen der Maus keinen Einfluß weder von PHA, Con A noch von Endotoxin auf die Aktivität der Adenylzyklase feststellte.

Über den Einfluß von Mitogenen auf die Aktivität der Guanylzyklase ist nichts bekannt.

Es sind uns keine Ergebnisse bekannt, nach denen Theophyllin, welches die Phosphodiesterase und damit den Abbau von 3',5'-cAMP hemmt, eine stimulierende Wirkung auf Lymphozyten hat. Es liegen dagegen eine Reihe von Untersuchungen vor, die zeigen, daß Theophyllin sowohl die antigene als auch die mitogene Stimulierung von Lymphozyten dosisabhängig hemmt (DERUBERTIS et al. 1974, HADDEN et al. 1970, HIRSCHHORN et al. 1970, WATSON et al. 1973).

Die Wirkung von exogenem 3',5'-cAMP auf die Stimulierung von Lymphozyten scheint biphasisch zu sein. Niedrige Konzentrationen von 3',5'-cAMP (ca. 10^{-11}M) erhöhen die DNA-Synthese in Thymuszellkulturen (MACMANUS & WHITFIELD 1969), und stimulieren die DNA-Synthese in humanen Blutlymphozyten (GALLO & WHANG-PENG 1971, HIRSCHHORN et al. 1970, MCCREERY & RIGBY 1971, SMITH et al. 1971 b) und Knochenmarkszellen in vitro (BYRON 1972).

Konzentrationen höher als 10^{-5} bis 10^{-4}M zeigen dagegen meist eine inhibierende

Wirkung sowohl auf unstimulierte als auch auf mitogen stimulierte Lymphozyten. Die Stimulierung der Produktion von spezifischen Antikörpern wird ebenfalls durch niedrige 3',5'-cAMP-Konzentrationen erhöht (BRAUN & ISHIZUKU 1971), während höhere Konzentrationen wieder eine Inhibierung zeigen (BÖSING-SCHNEIDER 1973).

Über den Effekt von exogenem 3',5'-cGMP auf die Aktivierung von Lymphozyten liegen nur wenige Ergebnisse vor.

In Zellkulturen aus humanen Leukozyten wurde durch exogenes 3',5'-cGMP eine Hemmung der DNA-Synthese in PHA-stimulierten Lymphozyten gefunden (KRISHNARAJ & TALWAR 1973, SMITH et al. 1971 b). Andererseits fanden WHITFIELD et al. 1971 a eine Erhöhung der Teilung und der DNA-Synthese in Thymuszellkulturen durch exogenes 3',5'-cGMP bei einer sehr niedrigen (ca. 10^{-11} M) und bei einer sehr hohen (ca. 10^{-6} M) Konzentration.

Obwohl die Maus in vieler Hinsicht ein gutes Objekt für immunologische Untersuchungen sowohl in vivo als auch in vitro ist, liegen bis jetzt nur wenige Ergebnisse über den Einfluß der zyklischen Nukleotide auf die Stimulierung der Lymphozyten dieses Tieres vor.

Eine gründliche Untersuchung über die Rolle von zyklischen Nukleotiden bei der antigenen Aktivierung von Lymphozyten der Maus liefert eine Arbeit von WATSON 1973. Er fand, daß exogenes 3',5'-cGMP einen aktivierenden Einfluß auf die antigene Stimulierung von Milzzellen der Maus hat, während 3',5'-cAMP eine antigene Stimulierung zu hemmen vermag. Da 3',5'-cGMP außerdem die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP auf die antigene Stimulierung aufzuheben vermag (WATSON 1973), hat das Dualismuskonzept der biologischen Kontrolle durch zyklische Nukleotide (GOLDBERG 1974) hier offensichtlich Gültigkeit.

Die Untersuchungen über die Rolle von exogenem 3',5'-cGMP auf die Stimulierung der DNA-Synthese und der Proliferation von Lymphozyten sind bisher lückenhaft. Außerdem fehlen Ergebnisse über den Einfluß von exogenen zyklischen Nukleotiden auf die mitogene Aktivierung der Lymphozyten der Maus. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, den Einfluß von zyklischen Nukleotiden, insbesondere von 3',5'-cGMP, auf die DNA-Synthese und auf die mitogene Stimulierung von Lymphozyten der Maus zu untersuchen. Dabei sollte ihre mögliche Rolle als "second messenger" und das Dualismuskonzept der biologischen Kontrolle durch diese zyklischen Nukleotide in diesem System untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere

Es wurden Inzuchtsmäuse verwendet, und zwar vom Stamm BALB/c und sogenannte "nude" Mäuse (BALB/c-nu/nu), das sind Mäuse mit einem angeborenen Defekt, die sowohl nackt sind (kein Fell haben), als auch keinen funktionsfähigen Thymus besitzen und damit auch keine reifen T-Lymphozyten. Die männlichen oder weiblichen Tiere wurden in einem Alter von sechs bis acht Wochen geliefert und in der Regel nicht später als vier Wochen danach verwendet. Die Mäuse wurden entweder durch Ausrenken des Genicks oder durch Decaptation nach Ätherbetäubung getötet.

Lieferant der Tiere war die Tierzuchtsanstalt Dr. Friis, Bomholtgard, Dänemark.

2.2. Chemikalien und Medien

Sämtliche Nukleotide, Nukleoside und Actinomycin D stammen von der Fa. Boehringer (Mannheim). PHA und LPS wurden von Difco (Detroit, Mich. U.S.A.) geliefert, Con A von Calbiochem (Los Angeles, Calif. U.S.A.), Cycloheximid, Cytochalasin B, DS, und EGTA von Serva (Heidelberg), Colcemid von Geigy (Basel), PPO, POPOP, Theophyllin, Papaverin, Acetylcholin, Colchicin von Merck (Darmstadt) und das Ionophore A 23187 von Lilly Laboratories (Indianapolis, U.S.A.). PG F_{2α} und PG E₂ wurden uns freundlicherweise von der Fa. Schering, Berlin zur Verfügung gestellt.

Die Substanzen wurden in steriler 0.9% NaCl gelöst und in einem Volumen von 20 µl/ml den Zellkulturen zugegeben. EGTA wurde in 0.9% NaCl suspendiert und durch Zugabe von 10% NaOH in Lösung gebracht, danach durch Zugabe von 1 N HCl wieder auf pH 7.1 eingestellt und steril gefiltert (Membranfilter 0.2 µ; Fa. Sartorius, Göttingen). Cytochalasin B und A 23187 wurden in DMSO gelöst. Von A 23187 wurde eine Stammlösung von 5.31 mg/ml hergestellt, die in einzelnen Portionen von 10 µl bei -20°C aufbewahrt wurden. Cytochalasin B und A 23187 wurden in einem Volumen von 1 µl/ml den Zellkulturen zugegeben. RPMI-1640 Medium (Fa. Gibco/Biocult, Glasgow, Schottland) wurde mit 2 mM L-Glutamin, 100 U Penicillin und 100 µg Streptomycin pro ml versetzt (im Folgenden nur kurz Kulturmedium genannt). Hanks-BSS 10 x (Gibco/Biocult) wurde vor dem Gebrauch mit sterilem Aqua bidest. 1:10 verdünnt (Hanks-BSS). FKS (Gibco/Biocult) oder HS (in der Regel ein Spender mit der Blutgruppe A Rh pos) wurde zum Inaktivieren des Komplementsystems für 30 min im Wasserbad bei 56°C erwärmt.

2.3. Herstellung der Zellsuspensionen

2.3.1. Milz-, Thymus- und Lymphknoten-Zellsuspensionen

Milz, Thymus oder Lymphknoten wurden den Tieren entnommen, dreimal innerhalb einer geschlossenen sterilen Petrischale mit 0.9% NaCl gewaschen (jeweils 6 - 10 ml pro Waschvorgang) und vorsichtig von fremdem Gewebe befreit. In eiskaltem Kulturmedium (10 oder 20 ml, je nach Anzahl der Organe, in 60/15 oder 94/16 Petrischalen für die Gewebekultur, Fa. Greiner, Nürtingen) wurden die Organe mit Hilfe von Pinzetten zerrieben. Gewebsfragmente ließen wir in einem spitzen Zentrifugenglas absedimentieren (ca. 10 min im Eisbad). Der Überstand wurde zentrifugiert (250 g, 10 min., 4°C) und die Zellen in ca. 2 - 4 ml Kulturmedium resuspendiert. Fanden sich dann wieder Gewebsfragmente in der Suspension, wurde sie durch ein feines Sieb aus rostfreiem Stahl gefiltert. Die Zahl der kernhaltigen Zellen in dieser Stammzellsuspension wurde in einer Zählkammer unter einem Mikroskop bestimmt. Zum kurzfristigen Aufbewahren wurden die Zellen immer in einem Eisbad gehalten, um eine Adhärenz der Zellen zu vermeiden.

2.3.2. Knochenmark-Zellsuspension

Zum Herstellen einer Knochenmark-Zellsuspension wurde der Femur vorsichtig vom Muskelfleisch befreit und fünf mal mit 0.9% NaCl gewaschen. Nach Öffnen der Markhöhle an beiden Enden des Knochens wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 2-ml-Plastik-Spritze mit aufgesetzter Kanüle Nr. 18 mit insgesamt 4 ml Kulturmedium aus der Markhöhle ausgespült. Durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausdrücken mit der Spritze wurden die Zellen in Suspension gebracht, einmal mit Kulturmedium gewaschen (250 g, 10 min., 4°C) und zum Schluß mit ca. 2 - 4 ml Kulturmedium aufgenommen. In dieser Stammzellsuspension wurde die Zahl der kernhaltigen Zellen bestimmt.

2.3.3. Peritoneal-Zellsuspension

Ca. 6 ml eiskaltes Kulturmedium wurde den getöteten Tieren in die Bauchhöhle injiziert. Der Bauch wurde nun kräftig massiert. Tiere, deren Darm versehentlich verletzt wurde, wurden nicht weiter verwendet. Nach ca. 5 min. wurde das Medium mit den suspendierten Zellen mit einer 5-ml-Plastik-Spritze (Kanüle Nr. 18) wieder aus der Bauchhöhle abgesaugt, die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen (250 g, 10 min., 4°C) und in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. In dieser Stammzellsuspension wurde die Zellzahl bestimmt.

2.4. Viabilitätstest

Ein Volumen Zellsuspension (ca. $2 - 10 \times 10^6$ Zellen pro ml) wurde mit einem Volumen Trypanblau-Verdünnung (0,2% Trypanblau in 0,9% NaCl) gut vermischt und fünf Minuten bei 37°C inkubiert. In einer Zählkammer wurden die blau gefärbten (toten) und die ungefärbten (lebenden) Zellen gezählt. Die Viabilität wird als % der lebenden von der Gesamtzellzahl ausgedrückt. Es wurden jeweils 100 - 200 Zellen ausgezählt.

2.5. Differentialzählung der Zellen

Kulturmedium mit mindestens insgesamt 2×10^6 Zellen wurde zentrifugiert (250 g, 10 min., 4°C), der Überstand abgesaugt (dabei bleibt immer ein Rest Medium zurück) und die Zellen mit einem Zusatz von 20 - 50 µl HS resuspendiert. Von dieser Suspension wurde ein Tropfen von ca. 20 µl auf der einen Schmalseite eines Objektträgers aufgetragen und mit Hilfe einer Deckglaskante auf dem Objektträger ausgestrichen. Die Ausstriche wurden an der Luft getrocknet und anschließend mit einer Pappenheim-Färbung (kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung) gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden nach morphologischen Kriterien (Verhältnis Zytoplasma:Kern, Struktur des Kerns, Anzahl der Kerne, Chromatindichte des Kerns, Vorhandensein eines Nukleolus) unter dem Mikroskop mittels Ölimmersion entsprechend ihrer Zellart identifiziert. Es wurden insgesamt 100 - 200 Zellen ausgezählt.⁺

2.6. Techniken zur Zellseparierung

Für die Trennung von verschiedenen Zellarten aus einer gemischten Zellpopulation sind zahlreiche Methoden entwickelt worden. Die hier angewandten Techniken beruhen auf den unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen, aktiv an Oberflächen zu adhären und/oder ihren unterschiedlichen Fähigkeiten zur Phagozytose.

2.6.1. Glasperlen-Säule

Zur Abtrennung von Makrophagen und Granulozyten aus einer gemischten Zellpopulation ist von RABINOWITZ 1964 eine Methode beschrieben worden, in der humane Blutzellen in einer Glasperlen-Säule inkubiert werden, deren Eluat nur noch wenige Makrophagen und Granulozyten enthält. Es konnte gezeigt werden, daß mit dieser Methode auch Milzzellen der Maus von Makrophagen und Granulozyten gereinigt werden können, ohne die Lymphozytenpopulation wesentlich zu beein-

⁺ Ein Teil der Differentialzählungen wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. S. Ben-Efraim durchgeführt.

fließen (SHORTMAN et al. 1971). Die von uns benutzte Methode wurde folgendermaßen durchgeführt: Glasperlen ($\emptyset$ ca. 200 μ m, Superbrite Glass Beads, 3 M Company, St. Paul, Minnesota, U.S.A.) wurden über Nacht in Nitriersäure (Schwefelsäure : Salpetersäure 1 : 1) gereinigt, anschließend mit Aqua bidest. so oft gespült, bis das Spülwasser neutral reagierte, und bei ca. 80°C in einem Trockenschrank getrocknet. Glaswolle (Merck, Darmstadt) wurde auf die selbe Weise gereinigt und getrocknet. Eine 10-ml-Plastik-Spritze (Stylex, mit Lock Tip) mit einem aufgesetzten 3-Wege-Sperrventil wurde zuerst mit einer dünnen Schicht Glaswolle gestopft und dann bis zur 10-ml-Marke mit den Glasperlen gefüllt. Die so vorbereitete Glasperlen-Säule wurde im Autoklaven bei 120°C sterilisiert. Vor dem Beladen der Säule mit den zu trennenden Zellen wurde die Säule mit 50 ml 0.9% NaCl, mit 50 ml Hanks-BSS und mit 50 ml Kulturmedium (mit 5% inaktiviertem FKS) gespült. Anschließend wurde die Säule mit 1.5×10^8 kernhaltigen Milzzellen, suspendiert in 3 ml Kulturmedium mit 5% inaktiviertem FKS, beschickt. Die so beladene Säule wurde für 45 min. in einem Brutschrank (KB 600 K, W.C. Heraeus GMBH, Hanau) bei 37°C in feuchter Luft mit 5% CO₂ inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden mit insgesamt 50 ml vorgewärmtem (37°C) Kulturmedium mit 5% inaktivierten FKS tropfenweise (ca. 1 Tropfen pro sec.) eluiert, zweimal mit Kulturmedium gewaschen (250 g, 10 min., 4°C) und in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. In einem Aliquot wurde eine Differentialzählung der Zellen durchgeführt. In Tabelle 1 wird die Zusammensetzung einer Milzzellpopulation vor und nach der Auftrennung in einer Glasperlen-Säule in drei verschiedenen Versuchen gezeigt. In allen Versuchen ist der Anteil der Makrophagen und Granulozyten in der nicht-adhärenenten Zellpopulation deutlich niedriger als in der ursprünglichen Milzzellpopulation. Neben einer Anreicherung an Lymphozyten ist außerdem eine Erhöhung der Viabilität in der nicht-adhärenenten Zellpopulation festzustellen.

TABELLE 1: Die Differenzierung der Zellarten in Milzzellpopulationen vor und nach einer Reinigung über eine Glasperlen Säule.

	LY		MA		GR		EO		VB		Ausbeute
	o	na	o	na	o	na	o	na	o	na	
Exp. I	78%	91%	9%	4%	12%	7%	1%	0,5%	93%	98%	22%
Exp. II	82%	96%	8%	4%	9%	4%	1%	1%	81%	95%	46%
Exp. III	88%	99%	8%	0,5%	3%	0,5%	1%	0%	84%	90%	24%

LY: Lymphozyten; MA: Makrophagen; GR: Granulozyten; EO: Eosinophile;
 VB: Viabilität; o: % der Zellen in der ursprünglichen Milzzellpopulation;
 na: % der Zellen in der nichtadherenten Milzzellpopulation.

2.6.2. Nylonwolle-Säule

In einer weiteren Methode, die sich der aktiven Adhärenz von Zellen an Oberflächen bedient, konnten JULIUS et al. 1973 aus einer Milzzellpopulation der Maus neben Makrophagen und Granulozyten auch noch die immunglobulintragenden Zellen (B-Zellen) entfernen. Sie fanden, daß das Eluat einer Nylonwolle-Säule aus einer Zellpopulation mit 90% T-Zellen besteht gegenüber 45% in der ursprünglichen Milzzellpopulation. Die im Folgenden beschriebene Methode hält sich im Wesentlichen an die von JULIUS et al. beschriebene:

Nylonwolle (LP-1 Leuko-Pak Leukocyte Filter, Fenwal Laboratories, Morton Grove U.S.A.) wurde für 2 h in 0.1 N HCl gewässert, 2 Tage in fließendem Leitungswasser gespült, 3 mal mit Aqua bidest. nachgespült und bei 60 - 70°C im Trockenschrank getrocknet. Eine 10-ml-Plastik-Spritze (Stylex, mit Lock Tip) mit einem aufgesetzten 3-Wege-Sperrventil wurde mit 1.4 g vorbehandelter Nylonwolle gestopft und autoklaviert. Vor Gebrauch wurde die Säule befeuchtet, anschließend haben wir mit dem Stößel der Spritze die Nylonwolle schwach zusammengedrückt. Das Vorspülen und Beladen der Säule und das Eluieren der nicht-adhärenenten Zellen geschah wie bei der Glasperlen-Säule beschrieben. Die eluierten Zellen wurden zweimal mit Kulturmedium gewaschen (250 g, 10 min., 4°C) und in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. In einem Aliquot wurde die Viabilität bestimmt und eine Differentialzählung der Zellen durchgeführt.

Mindestens 98 % des Eluats einer Nylonwolle-Säule sind Lymphozyten (Tab. 2). Auch erscheint diese Lymphozytenpopulation bei der mikroskopischen Betrachtung wesentlich homogener als die Zellpopulation des Eluats einer Glasperlen-Säule: man findet fast nur noch kleine Lymphozyten.

2.6.3. Trennung der Zellen mit Hilfe von LSR

LICHTENSTEIN et al. beschrieben eine Methode, mit der sie aus humanen Blutzellen die phagozytierenden Zellen abtrennten. Sie benutzten dazu das Reagenz LSR (Technicon Instruments Corporation, Tarrytown N.Y., U.S.A.), LSR ist eine Lösung aus Hanks-BSS, Ficoll, Heparin und Dextrose, mit einem Überschuß an Magnesium- und Kalziumionen, in der mikroskopische, magnetische, mit Poly L-Lysin aktivierte Partikel suspendiert sind. Die Zusammensetzung wird vom Hersteller leider nicht genauer angegeben. Wir verwendeten eine nach Müller-Ruchholz⁺ modifizierte Methode. Nicht unerwähnt bleiben soll die Tatsache, daß man neben Makrophagen und Granulozyten auch einige wenige B-Zellen in der abgetrennten Zellpopulation findet (MÜLLER-RUCHHOLZ pers. Mitteilung).

⁺ persönliche Mitteilung

TABELLE 2: Die Zellarten in Milzzellpopulationen vor und nach einer Reinigung über eine Nylonwolle-Säule

	LY		MA		GR		EO		VB		Ausbeute
	o	na	o	na	o	na	o	na	o	na	
Exp. I	78%	98%	9%	1%	12%	1%	1%	0%	93%	98%	8%
Exp. II	87%	98%	7%	1%	6%	1%	0%	0%	79%	91%	15%
Exp. III	82%	99%	8%	1%	9%	0%	1%	0%	81%	94%	23%
Exp. IV	88%	99,5%	8%	0,5%	3%	0%	1%	0%	84%	89%	28%

Abkürzungen wie in Tabelle 1

1×10^8 Milzzellen in 5 ml Kulturmedium mit 10% inaktiviertem HS wurden mit 5 ml LSR gemischt. Diese Suspension wurde in einer 94/14 Petrischale für Gewebekulturen für 45 min. bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO_2 auf einer Rocker-Plattform (Bellco Glass, Vineland, N.J., U.S.A.) mit 10 Schwingungen pro min. inkubiert. Danach wurde die Petrischale auf einen schräggestellten starken Magnetblock gestellt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die Suspension mehrmals über den Boden der Petrischale laufen gelassen, so daß die Zellen, die die magnetischen Partikel phagozytiert hatten, ebenso wie die nicht phagozytierten Partikel am Boden festgehalten wurden. Dieser Vorgang wurde auf einer zweiten Petrischale wiederholt, der Überstand zwei mal gewaschen (250 g, 10 min., 4°C) und die Zellen in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. In einem Aliquot wurde eine Differentialzählung der Zellen durchgeführt. Peritonealzellen wurden von phagozytierenden Zellen gereinigt, indem 2×10^7 PZ in 1 ml Kulturmedium (mit 20% inaktiviertem HS) mit 3 ml LSR gemischt wurden. Diese Suspension wurde in 60/15 Petrischalen für Gewebekulturen inkubiert und weiterbehandelt wie es oben für Milzzellen beschrieben wurde.

TABELLE 3: Die Zellarten in einer Milzzellpopulation vor und nach der Behandlung mit LSR

	LY	MA	GR
ursprüngliche Milzzellpopul.	91%	7%	2%
nichtphagozyt. Milzzellpopul.	99%	1%	0.5%

Abkürzungen wie in Tabelle 1

TABELLE 4: Die Differenzierung der Zellarten von PZ-Populationen vor und nach der Behandlung mit LSR.

	LY		MA		GR	
	o	nph	o	nph	o	nph
Exp. I	14%	85%	84%	13%	2%	2%
Exp. II	8%	96%	89%	4%	3%	1%
Exp. III	18%	93%	80%	6%	2%	1%

LY: Lymphozyten; MA: Makrophagen; GR: Granulozyten;
o: % der Zellen in der ursprünglichen PZ-Population;
nph: % der Zellen in der nichtadherenten PZ-Population.

Tabelle 3 und 4 zeigen, daß diese Methode geeignet ist, die phagozytierenden Zellen sowohl aus Milzzell- als auch aus PZ-Populationen abzutrennen.

2.7. Zellkulturen

2.7.1. Bestimmung des Thymidineinbaus

Etwa 24 h nach einer mitogenen oder antigenen Stimulierung von Lymphozyten treten die stimulierten Zellen in die S-Phase ein, in der die DNA-Synthese stattfindet, auf die dann später eine Mitose folgt. Als ein Maß für die DNA-Synthese wird allgemein der Einbau von exogenem (^3H)TdR in das TCA-Präzipitat der Zellen angesehen. Diese Methode birgt jedoch einige Problematik in sich, der man sich bewußt sein sollte:

1. Thymidin kann unspezifisch an Protein gebunden werden (MORLEY & KINGDON 1972)
2. Der Transport von exogenem (^3H)TdR durch die Zellmembran und/oder die Thymidinkinase-Aktivität ist bei unterschiedlichen Kulturbedingungen und bei unterschiedlichen Zellarten möglicherweise verschieden (OLSEN & HARRIS 1975, WOLBERG 1971). Dadurch kann wegen einer veränderten Ausnutzung der beiden Wege für die dTMP-Synthese (de novo Synthese über UMP oder Phosphorylierung von TdR) die spezifische (^3H) Aktivität des dTMP-Pools variieren und so eine Veränderung der DNA-Syntheserate vortäuschen.
3. Eine unterschiedliche Viabilität der Zellen kann bei unterschiedlichen Kulturbedingungen eine veränderte DNA-Syntheserate vortäuschen. So gibt es z.B. bei einer höheren Überlebensrate innerhalb einer Kultur mehr Zellen, die DNA-Synthese zeigen, als in den Kontrollkulturen, obwohl die DNA-Synthese im Verhältnis zur Anzahl der überlebenden Zellen nicht verändert ist.

Wegen dieser Problematik der Bestimmung der DNA-Synthese ist es unerlässlich, neben

dieser Methode mit weiteren Parametern der Lymphozytenstimulierung die Gültigkeit der angemessenen Werte zu prüfen. In exemplarischen Versuchen wurde deshalb neben dem Thymidineinbau die Transformation der Lymphozyten in Blastzellen und/oder die Mitoserate (Anzahl der Colcemid-Metaphasen) bestimmt.

Zur Bestimmung des (^3H)TdR-Einbaus in die DNA wurden zwei Methoden verwendet:

2.7.1.1. Bestimmung des (^3H)TdR-Einbaus in Makro-Kulturen

Bei dieser konventionellen Methode wird der Thymidin-Einbau in dem alkoholunlöslichen TCA-Präzipitat von Zellen bestimmt. 6×10^6 Zellen, suspendiert in 3 ml Kulturmedium mit 5% inaktiviertem HS, wurden in 16 x 125 mm Einweg-Plastik-Geweberöhrchen (Falcon Plastics, Los Angeles, U.S.A.) in Gegenwart der entsprechenden Testsubstanzen inkubiert. Die Kulturen wurden für 24 h, 48 h, 72 h oder 120 h in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 gehalten. 4 h vor Kulturende wurden $2\text{ }\mu\text{Ci}$ (^3H)TdR (2 Ci/mM; Radiochemical Centre, Amersham) gelöst in 100 μl einer 0.9% NaCl-Lösung zu den Kulturen gegeben. Zur Bestimmung des Thymidin-Einbaus in die DNA wurden die Kulturen zentrifugiert und die Zellen einmal mit eiskalter 0.9% NaCl (5 ml pro Kultur) gewaschen (250 g, 10 min., 4°C). Anschließend wurden sie mit 5 ml eiskalter 5%TCA aufgenommen und in einem Whirl-Mix (Cenco Instrumenten, Breda, Holland) gut aufgewirbelt. Nach 20 min. im Eisbad wurde das Präzipitat zweimal mit 5 ml einer 5% TCA und einmal mit 5 ml Äthanol gewaschen (1500 g, 10 min., 4°C) und in 0.5 ml Hyamin (Packard Instruments International, Zürich, Schweiz) bei 60 - 70°C im Wärmeschrank gelöst. Diese Lösung wurde in insgesamt 10 ml eines Flüssigkeits-Szintillators (100 g Naphtalin + 10 g PPO + 250 mg POPOP ad 1 l Dioxan) aufgenommen und in Szintillations-Zählgläschen überführt. Der radioaktive Zerfall des Tritiums wurde in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Packard Type 3380) bestimmt. Die Ergebnisse sind entweder als Ipm/Kultur oder als % der mitogenen Antwort (Ipm in mitogen stimulierten Kulturen = 100 %) angegeben.

2.7.1.2. Bestimmung des (^3H)TdR-Einbaus in Mikro-Kulturen

Diese Methode der Kultivierung von Lymphozyten in Mikrotiterplatten und das Absaugen der Zellen auf Filter zur Bestimmung des Thymidin-Einbaus in einem halbautomatischen Verfahren wurde zuerst für die MLC von HARTZMAN et al. 1972 beschrieben. Sie ist jedoch ebenso brauchbar für die Untersuchung der mitogenen Stimulierung.

1×10^6 Zellen, suspendiert in 500 μl Kulturmedium mit 5% inaktiviertem HS, wurden in Eppendorf-Mikro-Reaktionsgefäßen mit den entsprechenden Testsubstanzen vermischt. Aus diesem Ansatz wurden je drei Kulturen zu je 150 μl in die Löcher

von Mikrotiter-Platten M 24 AR (C.A.Greiner, Nürtingen) pipettiert. Die Kulturen wurden dann für unterschiedliche Dauer bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert und für die letzten 4 h der Kulturzeit gepulst mit 0.1 µCi (³H)TdR (2Ci/mM) gelöst in 10 µl einer 0.9% NaCl-Lösung. Nach Ablauf der Kulturzeit wurden die Zellen mit einem "Multiple Cell-Culture Harvester" (Skatron, Lierbyen, Norwegen) auf einen Glasfiber-Filter gesaugt. Dazu wird ein Glasfiber-Filter zwischen die Backen des Filterhalters geklemmt. O-Ringe aus Gummi in diesem Filterhalter begrenzen das Feld für jede der zwölf Kulturen, die gleichzeitig mit dem Saugblock abgesaugt werden können. Der Saugblock wird zuerst auf eine Reihe leerer Löcher einer Mikrotiter-Platte gesetzt und zum Anfeuchten des Filters wird Aqua dest. durchgesaugt. Der Saugblock wird nun auf die erste Lochreihe mit zwölf Kulturen gesetzt und die Zellen für 20 sek. mit insgesamt ca. 20 ml Aqua dest. pro Kultur aus den Löchern ausgewaschen und im entsprechenden Feld des Filters aufgefangen.

Durch die Verwendung von Aqua dest. werden die Zellen aufgeschlossen und das radioaktive Material außerhalb der Zellkerne weggewaschen. Die Waschzeit von 20 sek. ist ausreichend für eine vollständige Überführung der Zellen auf die Filter: die in den Löchern zurückgebliebene Radioaktivität beträgt weniger als 1% der Aktivität, die auf dem Filter gefunden wird.

Nach dem Auswaschvorgang wird zum Vortrocknen Luft durch den Filter gesaugt (ca. 20 sek.) und der Filter aus den Haltebacken genommen. Ein neuer Filter wird eingesetzt und die nächsten zwölf Kulturen abgesaugt. Sind alle Kulturen abgesaugt, werden die Filter bei 60 - 70°C für 45 min. getrocknet. Die durch die O-Ringe vorgestanzten Felder lassen sich nun mit einer Pinzette leicht herauslösen und in Szintillations-Zählgläsern überführen. 5 ml eines Flüssigkeits-Szintillators (5 g PPO und 0.3 g POPOP gelöst in 1 l Toluol) werden zugegeben und der radioaktive Zerfall des Tritiums in einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Packard Type 3380) gemessen.

Die Ergebnisse sind entweder als Ipm/Kultur, als % der mitogenen Antwort (Ipm in mitogen stimulierten Kulturen = 100%) oder als Stimulationsrate (Ipm in Kulturen mit Testsubstanz/Ipm in Kontrollkulturen ohne Testsubstanz) angegeben.

2.7.2. Bestimmung der Lymphozytentransformation

4 x 10⁶ Zellen, suspendiert in 2 ml Kulturmedium mit 5% inaktiviertem HS, wurden für 72 h in 16 x 125 Einweg-Plastik-Geweberöhrchen (Falcon Plastics, Los Angeles, U.S.A.) bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Nach Ende der

Kulturzeit wurden alle Zellen abzentrifugiert und auf Objekträger ausgestrichen und gefärbt wie bei der Differentialzählung der Zellen beschrieben. Unter einem Mikroskop wurden mittels Ölimmersion 200 Zellen ausgezählt und die Anzahl der Blastzellen als % der Gesamtzellzahl bestimmt.

2.7.3. Bestimmung der Colcemid-Metaphasen

Sich teilende Zellen lassen sich durch Colcemid in der Metaphase arretieren. Colcemid verhindert u.a. die Ausbildung der Spindelfasern, so daß die Metaphasekerne nicht in die Anaphase treten können. Die Zahl der Metaphasekerne nach Inkubation der Zellen mit Colcemid gibt also die Zahl der Zellen an, die während der Inkubation in die Metaphase eingetreten sind. Diese Zahl ist demnach ein direktes Maß für die Zellproliferation.

4×10^6 Zellen, suspendiert in 2 ml Kulturmedium mit 5% inaktiviertem HS, wurden für 72 h inkubiert wie bei der Lymphozytentransformation beschrieben. 6 h vor Kulturrende wurde $0.2 \mu\text{g}$ Colcemid gelöst in $50 \mu\text{l}$ 0.9% NaCl zugegeben. Nach Kulturrende wurden die Zellen abzentrifugiert (250 g, 10 min., 4°C), in 3 ml vorgewärmter (37°C) 75 mM KCl aufgenommen und für 5 min. bei Zimmertemperatur inkubiert (hypotoner Schock). Danach wurden die Zellen wieder abzentrifugiert (250 g, 10 min.) und das Pellet mit 2 ml Fixierlösung (Methanol : Eisessig 2 : 1) aufgenommen, gut aufgewirbelt und wieder abzentrifugiert (250 g, 10 min.). Der Überstand wurde bis auf ca. 200 - 300 μl verworfen, das Pellet gut aufgewirbelt, 150 μl auf einen Objekträger aufgetragen und das Fixierungsmittel sofort über einer Gasflamme entzündet. Nach dem Verlöschen der Flamme wurden verbleibende Eisessigtröpfchen ablaufen gelassen. Die Kerne wurden nach Giemsa gefärbt. Unter einem Mikroskop mit Ölimmersion wurden die charakteristischen Metaphase- und Interphasekerne gezählt. Es wurden jeweils insgesamt 2000 Kerne ausgezählt. Die Ergebnisse sind als % der Metaphasekerne von der Gesamtzahl der Kerne ausgedrückt.

2.7.4. Gewinnung von LAF und LIF

1 bis 3 ml Zellsuspension (2×10^6 Zellen pro ml Kulturmedium) wurden in 16 x 125 Einweg-Plastik-Geweberöhrchen (Falcon Plastics, Los Angeles, U.S.A.) bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 inkubiert. Nach Kulturrende wurden die Zellen abzentrifugiert (250 g, 10 min., 4°C), der SUP abgenommen und steril filtriert (Membranfilter 0.2 μ , Sartorius, Göttingen). Teilweise wurde der SUP in 8/32 Dialyseschläuchen (Union Carbide Cor., Chicago, U.S.A.) gegen das 20 - 100fache Volumen Kulturmedium dialysiert. In Versuchen mit Hemmstoffen in den Kulturen wurden die SUPs 48 h lang dialysiert, wobei das Dialysat 6 mal gewechselt wurde, sonst nur 24 h bei einem Wechsel. Nach der Dialyse wurden die SUPs ein weiteres

mal steril gefiltert.

In einigen Versuchen wurden die Überstände in einem Mikro-Becher (b/HFD-1/20 Kapillarmembranfilter, Seva, Heidelberg) mit Hilfe von Unterdruck ultrafiltriert. Um ein Kollabieren der Kapillaren zu vermeiden, durfte der Druck nie geringer als 30 mm Hg werden.

Da die Kapillaren des Bechers vor dem Gebrauch mit Aqua bidest. gespült wurden, war das Ultrafiltrat stets hypoton. Es wurde deswegen bei Zimmertemperatur in einem Vakuum eingengt, die Osmolarität durch Gefrierpunktserniedrigung gemessen und mit Aqua dest. wieder auf 280 mOsmol eingestellt. Danach wurde das Ultrafiltrat steril gefiltert.

Die SUPs konnten ohne LAF- oder LIF-Aktivitätsverlust bei -20°C gelagert werden.

2.7.5. Bestimmung der LAF- und LIF-Aktivität

Die LAF- und die LIF-Aktivität wurde in Sekundärkulturen bestimmt. 1×10^6 Thymus- oder Milzzellen, suspendiert in 250 μl Kulturmedium mit 10% inaktiviertem HS, wurden in Eppendorf-Mikro-Reaktionsgefäßen mit verschiedenen Mengen (5-250 μl) von SUP aus primären Zellkulturen gemischt und mit entsprechenden Mengen Kulturmedium auf 500 μl aufgefüllt. Drei Kulturen zu je 150 μl wurden aus dieser Suspension in die Löcher von Mikro-Titerplatten M 24 AR pipettiert und der Thymidineinbau in 48 h Kulturen wie oben beschrieben (Bestimmung des $(^3\text{H})\text{TdR}$ -Einbaus in Mikrokulturen) bestimmt.

Die Ergebnisse sind entweder als Ipm/Kultur, als StR (Ipm in Sekundärkulturen mit SUP aus Primärkulturen/Ipm in Kontrollkulturen ohne SUP), als % der mitogenen Antwort (Ipm in mitogen stimulierten Kulturen ohne SUP = 100%) oder als PR (Ipm in Sekundärkulturen mit SUP aus Primärkulturen mit Testsubstanz/Ipm in Sekundärkulturen mit SUP aus Primärkulturen ohne Testsubstanz) angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die Kontrolle der mitogenen Stimulierung in vitro durch Ca^{++}

3.1.1. Die Hemmung der mitogenen Stimulierung durch EGTA und deren Aufhebung durch Ca^{++} .

In einem einführenden Experiment sollte die kritische Konzentration bestimmt werden, bei der EGTA die mitogene Stimulierung in unserem System hemmt. Die Ca^{++} -Konzentration in unserem Medium (RPMI-Medium + 5% Humanserum) beträgt 0.54 mM (flammenphotometrisch bestimmt). Es war also zu erwarten, daß bei einer EGTA-Konzentration von ca. 0.5 mM keine freien Ca^{++} -Ionen mehr im Medium vorhanden sind.

Milzzellen von BALB/c Mäusen wurden in Medium, das verschiedene Konzentrationen von EGTA enthielt, zusammen mit einem B-Zell-Mitogen (LPS oder DS) oder mit einem T-Zell-Mitogen (PHA oder Con A) inkubiert. In Parallelversuchen wurden Milzzellen in Medium mit EGTA (0.1 mM), einem Mitogen und verschiedenen Konzentrationen von CaCl_2 kultiviert.

Die Ergebnisse in Abb. 1 zeigen, daß eine EGTA-Konzentration von 0.6 mM ausreichend dafür ist, die mitogene Stimulierung sowohl durch ein B-Zell- als auch durch ein T-Zell-Mitogen vollständig zu hemmen. Die hemmende Wirkung von 1.0 mM EGTA auf die mitogene Stimulierung kann durch die Zugabe von 0.6 mM CaCl_2 zum Medium vollständig wieder aufgehoben werden. Diese Ca^{++} -Abhängigkeit der mitogenen Stimulierung scheint spezifisch zu sein, da die inhibierende Wirkung von EGTA nur durch Ca^{++} , aber nicht durch andere divalente Kationen wie Mg^{++} oder Zn^{++} aufgehoben werden kann (Tab. 5). Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß eine Ca^{++} -Konzentration von weniger als 0.2 mM ausreichend für eine maximale mitogene Stimulierung ist.

3.1.2. Die Ca^{++} -abhängige Periode der mitogenen Stimulierung

Um zu untersuchen, ob Ca^{++} während der ganzen Kulturzeit notwendig für die mitogene Stimulierung ist oder nur während einer bestimmten Periode, und um gegebenenfalls diese Ca^{++} -unabhängige Periode näher festzulegen, wurden zwei Versuchsreihen parallel durchgeführt:

a) EGTA wurde zu verschiedenen Zeiten nach dem Start der Zellkulturen mit einem Mitogen (LPS, DS, PHA oder Con A) den Kulturen zugesetzt.

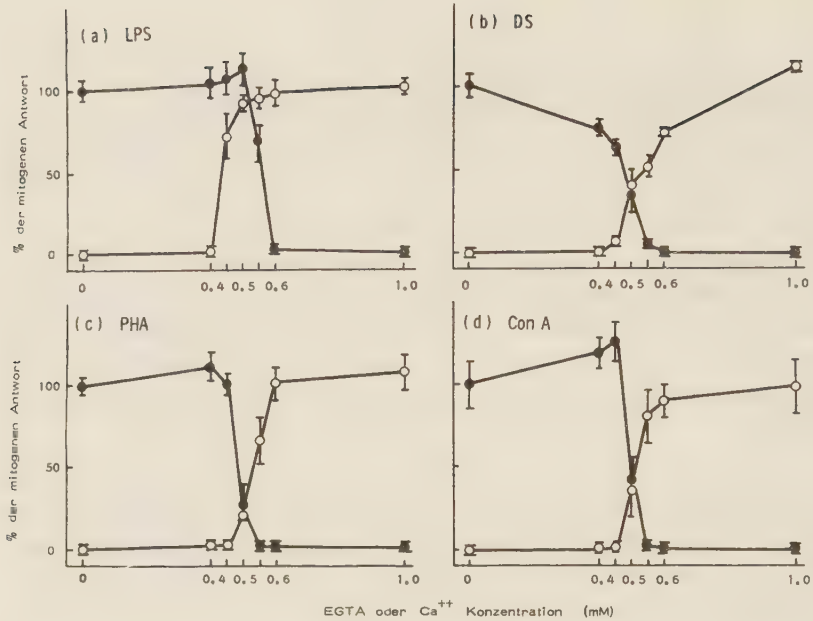


ABBILDUNG 1: Dosis-Effekt-Kurven der Wirkung von EGTA auf die mitogene Stimulierung und die antagonistische Wirkung von Ca^{++} auf den EGTA-Effekt. BALB/c Milzzellen wurden in Makro-Kulturen mit (a) LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (b) DS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (c) PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder (d) Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Vor der Mitogenzugabe zu den Kulturen wurden entweder verschiedene Konzentrationen von EGTA (0.4 - 1.0 mM) zugegeben (●), oder EGTA (1.0 mM) und verschiedene Konzentrationen (0.4 - 1.0 mM) von CaCl_2 (○). Nach einer Kulturdauer von 48 h wurde der Thymidineinbau in dem TCA-Präzipitat bestimmt. Die Ergebnisse sind als % der mitogen stimulierten Antwort angegeben. Jeder Wert gibt das arithmetische Mittel $\pm$ sam von drei Kulturen an.

b) Parallel dazu wurden den Kulturen, die im Medium ein Mitogen (LPS, DS, PHA oder Con A) und EGTA enthielten, zu verschiedenen Zeiten Ca^{++} zugesetzt.

Eine Zugabe von EGTA 36 h vor Kulturende inhibiert die mitogene Stimulierung des Thymidineinbaus bei allen Mitogenen fast vollständig. Eine spätere Zugabe ergibt eine entsprechend erhöhte Antwort (Abb. 2). Ca^{++} , das 12 h nach dem Start einer Kultur zugegeben wurde, hebt die hemmende Wirkung von EGTA fast vollständig auf.

Unter der Voraussetzung, daß die Zellen bei Ca^{++} -Mangel in Gegenwart des Mitogens in der unstimulierten G_0 -Phase verharren und erst nach Ca^{++} -Zugabe die Prozesse der Stimulierung beginnen, müßte sich abhängig vom Zeitpunkt der

TABELLE 5: Die Spezifität der Abhängigkeit der mitogenen Stimulierung von Ca^{++}

Kultur Medium	LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	DS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Ipm/Kultur	Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
ohne Zusatz	35315 $\pm$ 2906	27889 $\pm$ 418	89582 $\pm$ 11124	26051 $\pm$ 501
+EGTA	920 $\pm$ 223	166 $\pm$ 13	727 $\pm$ 202	284 $\pm$ 20
+EGTA + CaCl_2	38942 $\pm$ 2705	29120 $\pm$ 937	106612 $\pm$ 11346	32514 $\pm$ 1322
+EGTA + MgCl_2	988 $\pm$ 260	215 $\pm$ 19	935 $\pm$ 252	289 $\pm$ 3
+EGTA + ZnCl_2	338 $\pm$ 20	117 $\pm$ 10	113 $\pm$ 16	104 $\pm$ 8

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in Makro-Kulturen inkubiert. Vor dem Start der Kultur mit dem entsprechenden Mitogen wurde dem Kulturmedium EGTA (0.6 mM), CaCl_2 (0.6 mM), MgCl_2 (0.6 mM) oder ZnCl_2 (0.6 mM) zugesetzt wie in der Tabelle angegeben. Der Thymidineinbau wurde jeweils in drei Kulturen bestimmt. Die Ergebnisse geben das arithmetische Mittel $\pm$ sam an. Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz: 4120 $\pm$ 196 Ipm/Kultur.

Ca^{++} -Zugabe eine Verschiebung des zeitlichen Verlaufs der mitogenen Stimulierung ergeben. Aus dieser Überlegung heraus wurde folgender Versuch durchgeführt:

Milzzellen wurden in Medium mit LPS und EGTA inkubiert. o h, 12 h oder 24 h nach Kulturbeginn wurde Ca^{++} zugegeben und die DNA-Synthese nach einer Kulturdauer von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h bestimmt. Die mitogene Antwort auf LPS ist durch den zeitweiligen Ca^{++} -Mangel bei jeder Kulturdauer erniedrigt (Abb. 3). Die maximale Stimulierung liegt aber unabhängig von der Länge des Ca^{++} - Mangels bei einer Kulturdauer von 72 h vor.

3.2. Die Regulation der Proliferation von Lymphozyten durch zyklische und nicht-zyklische Nukleotide

3.2.1. Die Wirkung von 3',5'-cGMP und 3',5'-cAMP auf die DNA-Synthese in nicht stimulierten und mitogen stimulierten Lymphozyten der Maus.

Das Ziel dieser einführenden Experimente war, die Wirkung von exogenem 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP auf unstimulierte und mitogen stimulierte Lymphozyten zu prüfen. Es wurden deshalb unstimulierte und mit PHA stimulierte Milzzellen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von 3',5'-cGMP oder 3',5'-cAMP für

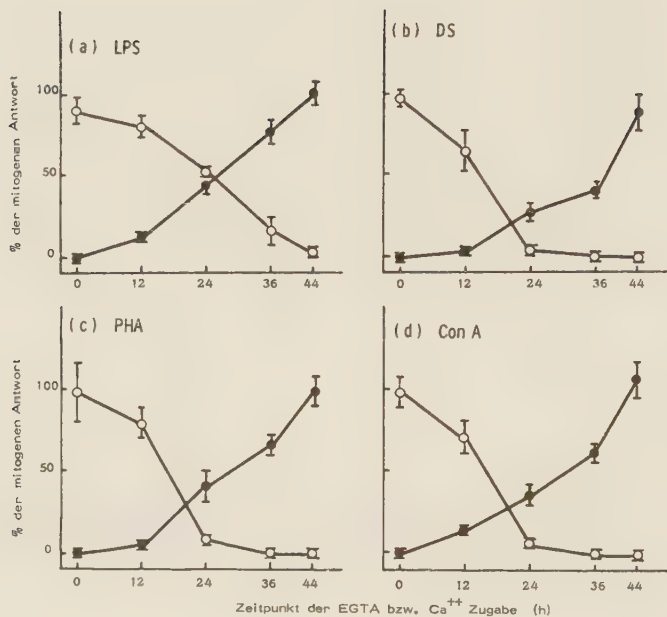


ABBILDUNG 2: Die Kinetik des Effektes von EGTA auf die mitogene Stimulierung und die Kinetik des Effektes von Ca⁺⁺ auf die inhibierende Wirkung von EGTA. Milzzellen von BALB/c Mäusen wurden in Makro-Kulturen mit (a) LPS (50 µg/ml), (b) DS (50 µg/ml), (c) PHA (10 µg/ml) oder (d) Con A (5 µg/ml) stimuliert. (●) EGTA (0.6 mM) wurde zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe des entsprechenden Mitogens den Kulturen zugegeben. (○) CaCl₂ (0.6 mM) wurde zu verschiedenen Zeiten nach dem Start der Kulturen mit den entsprechenden Mitogen den EGTA (0.6 mM) -haltigen Kulturen zugegeben. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h Kulturdauer bestimmt. Jeder Wert gibt das arithmetische Mittel $\pm$ sam aus drei Kulturen an.

48 h inkubiert.

In Konzentrationen größer als 1×10^{-4} M erhöht 3',5'-cGMP den Thymidineinbau der unstimulierten Milzzellen. Bei einer Konzentration von 5×10^{-3} M findet man eine Stimulationsrate von 6.3 (Abb. 4). 3',5'-cAMP dagegen zeigt eine leicht inhibierende Wirkung. In mit PHA stimulierten Milzzellen steigert 3',5'-cGMP die DNA-Synthese nur gering, eine Konzentration von 5×10^{-3} M vergrößert die PHA-Antwort nur um ca. 30% (Abb. 5). 3',5'-cAMP dagegen inhibiert die PHA-Antwort, wenn es in einer Konzentration größer als 1×10^{-4} M zu den Kulturen gegeben wird. Eine 3',5'-cAMP-Konzentration von 1×10^{-3} M hemmt dann die PHA-Antwort fast vollständig.

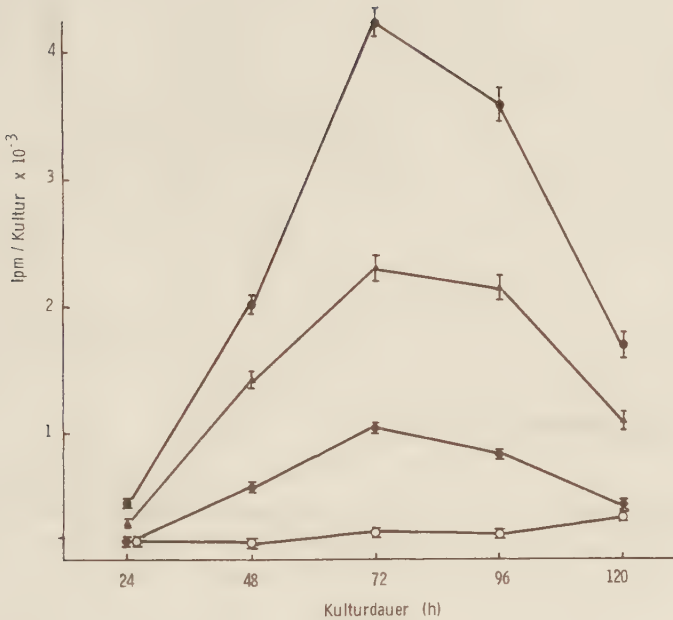


ABBILDUNG 3: Die Kinetik der LPS-Antwort bei zeitweiliger Abwesenheit von Ca^{++} . BALB/c Milzzellen wurden in Mikro-Kulturen mit LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Medium mit EGTA (0,6 mM) stimuliert. Oh, 12 h, oder 24 h, nach Beginn der Kultur wurde CaCl_2 (0,6 mM) den Kulturen zugegeben. Der Thymidineinbau wurde nach einer Kulturdauer von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h oder 120 h bestimmt. (●) CaCl_2 -Zugabe bei Kulturbeginn. (▲) CaCl_2 -Zugabe 12 h nach Kulturbeginn. (◆) CaCl_2 -Zugabe 24 h nach Kulturbeginn. (○) Kontroll-Kulturen ohne LPS, aber mit EGTA und CaCl_2 . Jeder Punkt gibt den Mittelwert $\pm$ sam aus sechs Kulturen an.

Ein Einfluß auf die DNA-Synthese von nicht stimulierten und mit PHA stimulierten Milzzellen durch 3',5'-cAMP bei einer Konzentration kleiner als $1 \times 10^{-4} \text{M}$ konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 6).

Da wir prüfen wollten, ob eine Spezifität der Stimulierung der DNA-Synthese durch 3',5'-cGMP für eine bestimmte Zellpopulation existiert, wurden Milz-, Thymus-, Lymphknoten-, und Knochenmarkzellen von BALB/c Mäusen und Milzzellen von Nude Mäusen für 38 h in Gegenwart von 3',5'-cGMP (1×10^{-5} bis $5 \times 10^{-3} \text{M}$) kultiviert. Wie Abbildung 7 zeigt, stimuliert 3',5'-cGMP dosisabhängig sowohl BALB/c Milz- und Knochenmarkszellen als auch Milzzellen von Nude Mäusen. Die stärkste Antwort zeigten Nude Milzzellen. Die StR in dem hier gezeigten

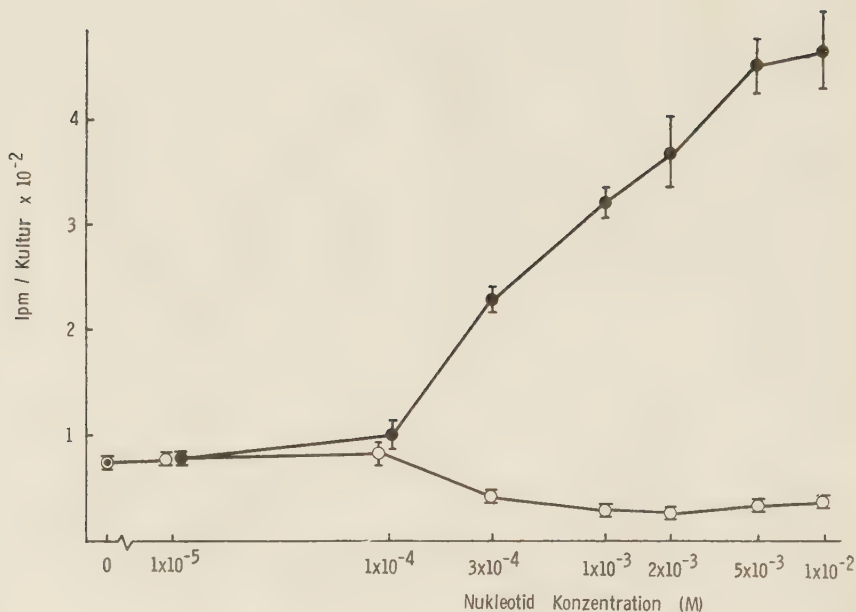


ABBILDUNG 4: Die Wirkung von 3',5'-cGMP und 3',5'-cAMP auf den Thymidineinbau in BALB/c Milzzellen. Milzzellen von BALB/c Mäusen wurden in Mikro-Kulturen für 48 h in Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 3',5'-cGMP oder 3',5'-cAMP inkubiert. (●) Milzzellen kultiviert in Medium mit 3',5'-cGMP. (○) Milzzellen kultiviert in Medium mit 3',5'-cAMP. (●) Kontroll Kulturen ohne Testsubstanz. Der Thymidineinbau wurde in jeweils drei Kulturen bestimmt. Jeder Punkt gibt den Mittelwert $\pm$ sam an.

Versuch beträgt 17.2 bei einer 3',5'-cGMP-Konzentration von 5×10^{-3} M. In BALB/c Thymuszellen wird die DNA-Synthese durch 3',5'-cGMP nur unwesentlich erhöht. Wir fanden in dem hier gezeigten Versuch eine StR von 2.1. Dieser Wert errechnet sich aus einer Erhöhung des Thymidineinbaus von 14 Ipm/Kultur in Kontrollkulturen auf 30 Ipm/Kultur in Kulturen mit 3',5'-cGMP bei einer optimalen Konzentration von 5×10^{-3} M. In Lymphknoten-Zellkulturen zeigt 3',5'-cGMP keinen Effekt auf die DNA-Synthese.

Um die Spezifität der Wirkung von 3',5'-cAMP auf 3',5'-cGMP auf die mitogene Stimulierung der DNA-Synthese zu untersuchen, wurden BALB/c Milz-, Thymus- und Knochenmarkzellen und Nude Milzzellen mit verschiedenen T- und B-Zell-Mitogenen in Gegenwart von 3',5'-cGMP oder 3',5'-cAMP stimuliert. Die Ergeb-

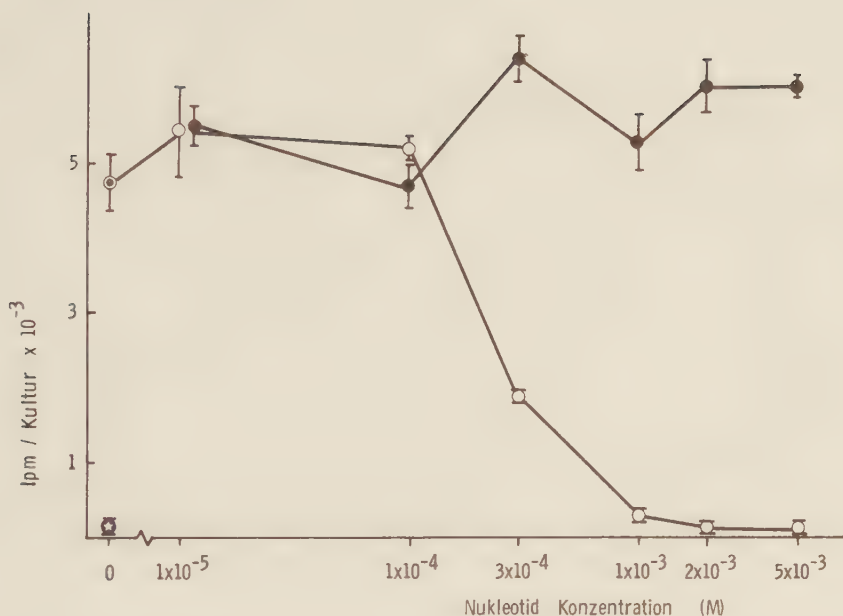


ABBILDUNG 5: Die Wirkung von 3',5'-cGMP und 3',5'-cAMP auf die PHA-Antwort von BALB/c Milzzellen. BALB/c Milzzellen wurden in Mikro-Kulturen mit PHA (10,ug/ml) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von 3',5'-cGMP oder 3',5'-cAMP stimuliert.

(●) PHA stimulierte Milzzellen in Gegenwart von 3',5'-cGMP.
 (○) PHA stimulierte Milzzellen in Gegenwart von 3',5'-cAMP.
 (★) PHA stimulierte Milzzellen ohne zyklische Nukleotide.
 (★) Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h Kulturdauer bestimmt. Jeder Punkt ist der Mittelwert $\pm$ sam aus drei Kulturen.

nisse sind in Abbildung 8 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß 3',5'-cAMP die mitogene Stimulierung in allen Zellpopulationen nahezu vollständig hemmt. Bei Knochenmarkszellen ist unter diesen Umständen der Thymidineinbau in den mit DS stimulierten Kulturen in Gegenwart von 3',5'-cAMP sogar noch weit unter die Einbauraten der Kontrollkulturen gesunken.

In Thymuszellen wird die Antwort auf Con A durch 3',5'-cAMP nur um ca. 50% gehemmt. Auch eine Erhöhung der Konzentration des Nukleotids bis $5 \times 10^{-3} M$ verstärkte die Hemmung nicht weiter.

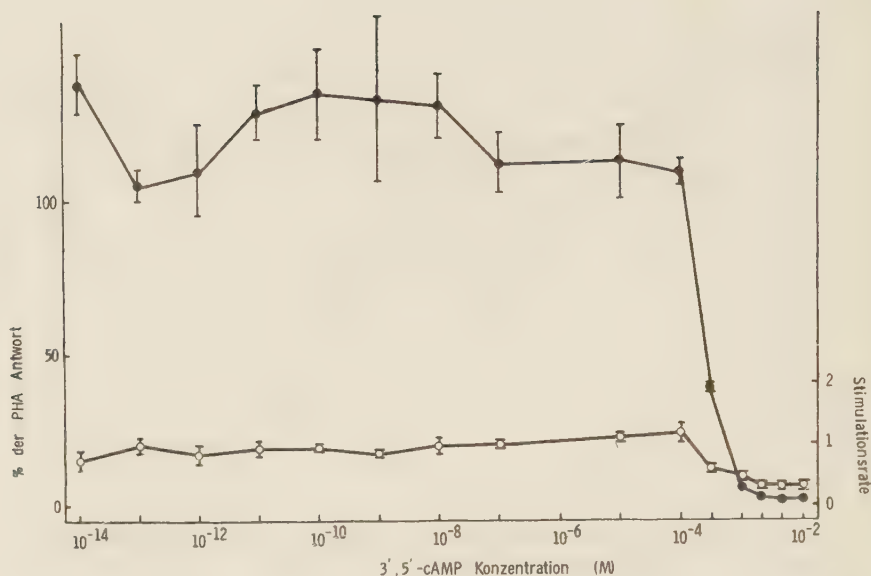


ABBILDUNG 6: Der Effekt von 3',5'-cAMP auf den Thymidineinbau in PHA stimulierten und unstimulierten Milzzellen. Durch PHA (10 µg/ml) stimulierte und unstimulierte BALB/c Milzzellen wurden in Mikro-Kulturen für 48 h zusammen mit verschiedenen Dosen von 3',5'-cAMP kultiviert. (●) Mit PHA stimulierte Milzzellen in Gegenwart von 3',5'-cAMP; die Ergebnisse sind als % der PHA Antwort angegeben. (○) Unstimulierte Milzzellen in Gegenwart von 3',5'-cAMP; die Ergebnisse sind als StR angegeben. Mit PHA stimulierte Kulturen: 5829 ± 115 Ipm/Kultur. Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz: 135 ± 15 Ipm/Kultur. Die Ergebnisse sind als der Mittelwert $\pm$ sam des Thymidineinbaus in jeweils drei Kulturen angegeben.

3.2.2. Die Wirkung verschiedener zyklischer und nicht zyklischer Nukleotide auf die DNA-Synthese in nicht stimulierten und mit LPS stimulierten Zellen

Um nach anderen Nukleotiden zu suchen, die die Proliferation von Lymphozyten beeinflussen, wurden weitere zyklische und nicht zyklische Nukleotide hinsichtlich ihrer Wirkung auf die DNA-Synthese der Zellen geprüft.

Unstimulierte und mit LPS stimulierte BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in Gegenwart der verschiedenen zyklischen und nicht zyklischen Nukleotide kultiviert. Die Nukleotide wurden in einem Dosis-Bereich von 1×10^{-7} M bis 5×10^{-3} M getestet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefaßt. Der größte

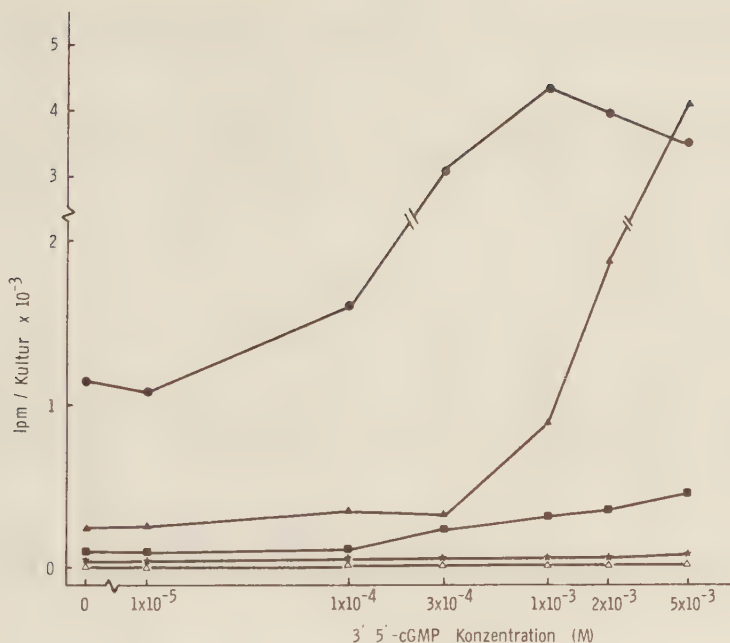


ABBILDUNG 7: Dosis-Effekt-Kurve der Wirkung von 3',5'-cGMP auf den Thymidineinbau in verschiedenen Lymphozytenpopulationen. BALB/c Milz-, Thymus-, Lymphknoten-, und Knochenmarkzellen und Nude Milzzellen wurden in Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 3',5'-cGMP inkubiert. (■) BALB/c Milzzellkulturen; (△) BALB/c Thymuszellkulturen; (★) BALB/c Lymphknotenzellkulturen; (●) BALB/c Knochenmarkzellkulturen; (▲) Nude Milzzellkulturen. Der Thymidineinbau wurde nach einer Kulturzeit von 48 h bestimmt. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus jeweils drei Mikro-Kulturen. sam war kleiner als 10%.

Teil der getesteten Nukleotide zeigt eine hemmende Wirkung auf die DNA-Synthese sowohl in unstimulierten (Tab. 6 a, b, c) als auch in mit LPS stimulierten Milzzellen (Tab. 7 a, b, c), wenn auch in unterschiedlicher Stärke, GMP, cUMP, 2',3'-cAMP und 8Br-cGMP haben keine Wirkung auf unstimulierte Zellen, aber mit Ausnahme von cUMP hemmen auch diese Nukleotide die Antwort auf LPS, wenn sie in einer Konzentration größer als $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ im Kulturmedium vorliegen.

Zwei der getesteten Nukleotide, nämlich GDP und 2',3'-cGMP, erhöhen den Thymidineinbau sowohl in unstimulierten (Tab. 6 a, c) als auch in mit LPS stimulierten Milzzellen (Tab. 7 a, c). GDP erhöht bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ im Kulturmedium die DNA-Synthese der Zellen in dem hier gezeigten

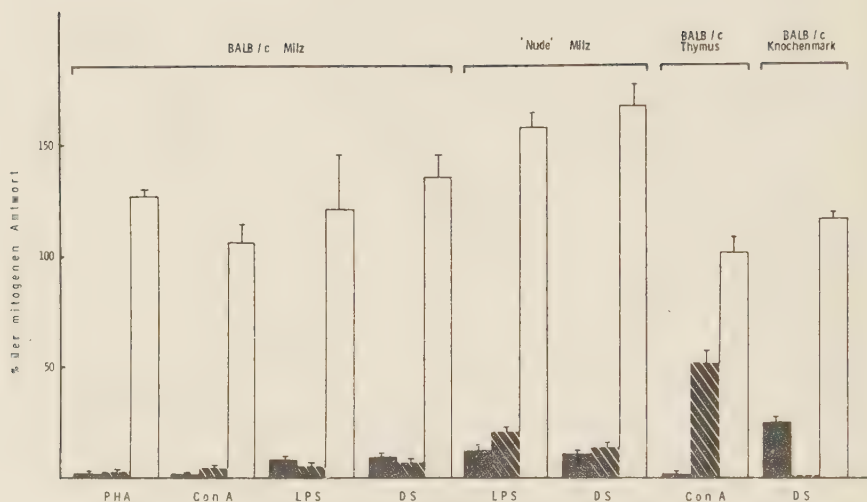


ABBILDUNG 8: Die Wirkung von 3',5'-cGMP und 3',5'-cAMP auf die mitogene Stimulierung in verschiedenen Lymphozytenpopulationen. BALB/c Milzzellen wurden mit PHA (10 µg/ml), Con A (5 µg/ml), LPS (50 µg/ml) oder DS (50 µg/ml) stimuliert, BALB/c Thymuszellen mit Con A (5 µg/ml), BALB/c Knochenmarkzellen mit DS (50 µg/ml) und Nude Milzzellen mit LPS (50 µg/ml) oder DS (50 µg/ml). Die Wirkung von 3',5'-cGMP (5 mM) und 3',5'-cAMP (1 mM) auf diese mitogene Stimulierung wurde in Mikroturen untersucht. Nach einer Kulturzeit von 48 h wurde der Thymidineinbau bestimmt. Gestreifte Balken: mitogen stimulierte Kulturen in Gegenwart von 3',5'-cAMP. Offene Balken: mitogen stimulierte Kulturen in Gegenwart von 3',5'-cGMP. Schwarze Balken: Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz. Der Mittelwert $\pm$ sam wurde aus jeweils drei Kulturen bestimmt.

Versuch um das 11fache und steigert die DNA-Synthese in durch LPS aktivierten Zellen um 20%. Das sind ähnliche Größenordnungen, wie sie mit 3',5'-cGMP gefunden worden sind (Abb. 4). GDP-Konzentrationen kleiner als 1×10^{-3} M haben keinen Einfluß auf den Thymidineinbau sowohl in unstimulierten als auch in mit LPS stimulierten Zellen.

Die Wirkung von exogenem 2',3'-cGMP auf die Lymphozyten ist dagegen wesentlich stärker: bei einer Konzentration von 1×10^{-3} M im Kulturmedium erhöht dieses zyklische Nukleotid die DNA-Synthese in Milzzellkulturen um fast das 60-fache (Tab. 6 c). Die Antwort in Zellen, die mit LPS und 2',3'-cGMP stimuliert

TABELLE 6a: Die Wirkung von nichtzyklischen Adenosin- und Guanosin Nukleotiden auf den Thymidineinbau in Milzzellen

Mol/l	AR	AMP	ADP	ATP	GR	GMP	GDP	GTP
5×10^{-3}	0.1	0.4	0.6	0.1	0.1	1.3	10.5	0.5
2×10^{-3}	-	-	-	-	-	-	9.1	-
1×10^{-3}	0.2	0.3	0.6	0.2	1.2	1.1	4.0	1.1
3×10^{-4}	-	-	-	-	-	-	1.0	-
1×10^{-4}	1.2	0.8	0.9	0.9	1.1	1.1	1.1	1.2
1×10^{-5}	1.3	0.9	0.8	1.1	1.0	0.8	1.1	1.1
1×10^{-6}	1.1	0.7	1.0	0.9	1.1	0.7	1.1	1.0
1×10^{-7}	1.1	0.7	1.0	1.1	1.2	0.8	0.8	1.0

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikrokulturen in Medium mit den angegebenen Substanzen kultiviert. Die Ergebnisse sind als StR angegeben.

TABELLE 6b: Die Wirkung zyklischer Pyrimidin- und zyklischer Inosin-Nukleotide auf den Thymidineinbau in Milzzellen

Mol/l	cIMP	mb-cIMP	cUMP	cCMP	cdTMP
5×10^{-3}	0.3	0.6	0.9	0.5	0.1
2×10^{-3}	-	1.0	1.0	0.8	1.0
1×10^{-3}	0.5	1.1	0.9	1.1	0.1
3×10^{-4}	-	1.2	0.9	1.2	0.3
1×10^{-4}	1.0	0.9	1.2	1.2	0.5
1×10^{-5}	0.9	0.9	1.2	1.2	1.0
1×10^{-6}	1.0	-	1.2	1.5	1.5
1×10^{-7}	1.2	-	0.9	1.3	1.2

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikro-Kulturen in Medium mit den angegebenen Substanzen kultiviert. Die Ergebnisse sind als StR angegeben.

wurden, ist zwar größer als bei mit LPS stimulierten Zellen, aber kleiner als in mit 2',3'-cGMP stimulierten Zellen (Tab. 8). Die Wirkungen von LPS und 2',3'-cGMP sind also weder additiv noch synergistisch.

3.2.3. Die Aktivierung von Lymphozyten in Gegenwart von Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von zyklischen Nukleotiden verändern.

Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration eines zyklischen Nukleotids erhöhen, sollten entsprechend den Kriterien von SUTHERLAND die selbe Wirkung

TABELLE 6c: Die Wirkung verschiedener zyklischer Adenosin- und Guanosin Nukleotide auf den Thymidineinbau in Milzzellen.

Mol/l	2',3'- cAMP	db- cAMP	8Br- cAMP	2',3'- cGMP	db- cGMP	8Br- cGMP
5x10 ⁻³	0.9	0.1	0.5	6.5	0.3	0.9
2x10 ⁻³	1.2	-	-	39.4	-	-
1x10 ⁻³	1.7	0.3	0.5	57.6	0.7	0.7
3x10 ⁻⁴	1.5	-	-	17.2	-	-
1x10 ⁻⁴	1.0	0.9	0.7	1.7	1.6	0.9
1x10 ⁻⁵	1.0	1.4	0.9	1.0	1.4	0.9
1x10 ⁻⁶	0.7	1.4	0.9	1.1	1.6	0.9
1x10 ⁻⁷	1.0	1.4	1.0	0.9	1.4	1.0

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikro-Kulturen in Medium mit den angegebenen Substanzen kultiviert. Die Ergebnisse sind als StR angegeben.

TABELLE 7a: Die Wirkung von nichtzyklischen Adenosin- und Guanosin-Nukleotiden auf den Thymidineinbau in LPS stimulierten BALB/c Milzzellen.

Mol/l	AR	AMP	ADP	ATP	GR	GMP	GDP	GTP
5x10 ⁻³	2	2	5	1	1	20	120	58
2x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-
1x10 ⁻³	23	2	5	3	33	39	86	62
3x10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
1x10 ⁻⁴	91	53	67	40	77	66	89	79
1x10 ⁻⁵	113	85	82	96	93	76	99	91
1x10 ⁻⁶	91	75	-	79	101	83	-	99
1x10 ⁻⁷	89	93	-	85	99	77	-	105

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikro-Kulturen in Medium mit den angegebenen Substanzen und LPS (50 µg/ml) kultiviert. Die Ergebnisse sind als % der LPS Antwort angegeben.

auf die Zellen haben wie das exogen gegebene Nukleotid selbst. Als Substanzen, die die intrazelluläre 3',5'-cAMP-Konzentration erhöhen, sind Theophyllin und Papaverin bekannt, die beide den Abbau des 3',5'-cAMP über eine Hemmung der Phosphodiesterase verhindern (ROBISON et al. 1971). PG E₂ dagegen erhöht die intrazelluläre 3',5'-cAMP-Konzentration durch Aktivierung der Adenylzyklase über einen Hormonrezeptor (ROBISON et al. 1971, KUEHL 1974). Die

TABELLE 7b: Die Wirkung zyklischer Inosin -Nukleotide und zyklischer Pyrimidin-Nukleotide auf den Thymidineinbau in mit LPS stimulierten BALB/c Milzzellen

Mol/l	cIMP	mb-cIMP	cUMP	cCMP	cdTMP
5×10^{-3}	6	47	85	41	1
2×10^{-3}	-	85	93	55	4
1×10^{-3}	42	100	87	69	7
3×10^{-4}	-	117	95	85	15
1×10^{-4}	96	110	88	82	31
1×10^{-5}	108	105	88	82	85
1×10^{-6}	85	-	100	93	105
1×10^{-7}	80	-	76	104	87

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikro-Kulturen in Medium mit den angegebenen Substanzen und LPS ($50 \mu\text{g/ml}$) kultiviert. Die Ergebnisse sind als % der LPS Antwort angegeben.

TABELLE 7c: Die Wirkung verschiedener zyklischer Adenosin- und Guanosin-Nukleotide auf den Thymidineinbau in mit LPS-stimulierten BALB/c Milzzellen.

Mol/l	2',3'-cAMP	db-cAMP	8Br-cAMP	2',3'-cGMP	db-cGMP	8Br-cGMP
5×10^{-3}	41	1	16	85	1	61
2×10^{-3}	76	-	-	250	-	-
1×10^{-3}	83	1	30	350	62	91
3×10^{-4}	108	-	-	240	-	-
1×10^{-4}	106	9	79	150	117	87
1×10^{-5}	111	94	110	100	105	113
1×10^{-6}	105	107	100	111	85	86
1×10^{-7}	115	120	96	103	114	105

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikro-Kulturen in Medium mit den angegebenen Substanzen und LPS ($50 \mu\text{g/ml}$) kultiviert. Die Ergebnisse sind als % der LPS Antwort angegeben.

3',5'-cGMP-Konzentration kann durch die beiden Hormone Acetylcholin und $\text{PG F}_{2\alpha}$ über eine Aktivierung der Guanylylzyklase durch Membranrezeptoren erhöht werden (GOLDBERG et al. 1973, KUHL 1974). Eserin ist ein Acetylcholinesterase-Hemmer. Dieses Enzym ist im Serum vorhanden und somit auch in mit Serum versetztem Kulturmedium zu finden.

Wir testeten diese Substanzen auf ihre Wirkung auf die DNA-Synthese in Milzzellen der Maus unter Zugabe von LPS und ohne Mitogen: sämtliche Substanzen

TABELLE 8: Das Fehlen einer synergistischen oder additiven Wirkung von LPS und 2',3'-cGMP.

Mitogen Zugabe		Thymidineinbau Ipm/Kultur	StR
LPS	(50 μ g/ml)	1449 $\pm$ 102	14
2',3'-cGMP	(1 mM)	5814 $\pm$ 120	58
LPS + 2',3'-cGMP	(50 μ g/ml) (1 mM)	5049 $\pm$ 345	50
nihil		101 $\pm$ 6	1

BALB/c Milzzellen wurden in Medium mit den angegebenen Substanzen kultiviert. Nach 48 h in Mikro-Kultur wurde der Thymidineinbau bestimmt. Jeder Wert ist das arithmetische Mittel $\pm$ sam aus drei Kulturen.

TABELLE 9a: Die Hemmung der DNA-Synthese von Lymphozyten durch Substanzen, die die Höhe der intrazellulären Konzentration von zyklischen Nukleotiden beeinflussen.

Mol/l	Papa verin	Theo phylin	Acetyl cholin	Eserin	Acetyl- cholin +Eserin (10 μ M)	PG E ₂	PG F _{2α}	μ g/ ml
5x10 ⁻³	0.1	0.3	0.6	-	0.5	0.1	0.2	300
1x10 ⁻³	0.1	0.2	1.1	-	1.0	0.5	0.6	100
3x10 ⁻⁴	-	0.5	1.0	0.1	-	0.6	0.5	50
1x10 ⁻⁴	0.1	0.8	0.8	0.5	0.9	0.6	1.1	20
1x10 ⁻⁵	0.2	-	1.0	0.7	0.9	0.8	0.9	10
1x10 ⁻⁶	0.8	-	0.9	0.9	0.8	0.7	1.0	5
1x10 ⁻⁷	1.1	-	0.9	1.0	0.9	0.7	1.0	2

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikroturen in Medium mit den angegebenen Substanzen kultiviert. Die Ergebnisse sind als StR angegeben.

haben keinen aktivierenden Effekt auf die Lymphozyten, sondern inhibieren die DNA-Synthese sowohl in unstimulierten (Tab. 9a) als auch in mit LPS stimulierten Lymphozyten (Tab. 9b)

3.2.4. Der zeitliche Verlauf der DNA-Synthese von Lymphozyten nach Stimulierung mit 3',5'-cGMP, 2',3'-cGMP und GDP

Um die optimale Kulturdauer für eine Stimulierung des Lymphozyten mit 3',5'-cGMP, 2',3'-cGMP und GDP zu bestimmen, wurden BALB/c Milzzellen mit

TABELLE 9b: Die Hemmung der LPS-Antwort von Lymphozyten durch Substanzen, die die Höhe der intrazellulären Konzentration von zyklischen Nukleotiden beeinflussen.

Mol/l	Papa verin	Theo phylin	Acetyl cholin	Eserin	Acetyl- cholin +Eserin (10 / μ M)	PG E ₂	PG F _{2α}	/ μ g/ ml
5x10 ⁻³	1	2	56	-	-	1	14	300
1x10 ⁻³	1	7	86	-	-	59	59	100
3x10 ⁻⁴	-	27	103	2	-	59	73	50
1x10 ⁻⁴	1	63	107	47	-	76	85	20
1x10 ⁻⁵	14	-	106	67	-	79	83	10
1x10 ⁻⁶	80	-	105	89	-	87	94	5
1x10 ⁻⁷	94	-	101	101	-	86	99	2

BALB/c Milzzellen wurden für 48 h in jeweils drei Mikrokulturen in Medium mit LPS (50 μ g/ml) und den angegebenen Substanzen kultiviert. Die Ergebnisse sind als % der LPS-Antwort angegeben.

optimalen Dosen dieser Nukleotide stimuliert und die DNA-Synthese in 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h Kulturen bestimmt.

Schon nach 24 h verursachen sowohl 2',3'-cGMP als auch 3',5'-cGMP eine deutliche Steigerung der DNA-Synthese in Milzzellen, GDP dagegen erhöht zu diesem Zeitpunkt die DNA-Synthese der Zellen nur unwesentlich (Abb. 9). Eine maximale Stimulierung wird durch alle drei Nukleotide nach einer Kulturdauer von 48 h erreicht. Nach einer Kulturdauer von 120 h ist die DNA-Synthese im Vergleich zu den Kontrollkulturen nicht erhöht.

3.2.5. Die Stimulierung der DNA-Synthese in Lymphozyten verschiedenen Ursprungs durch GDP und 2',3'-cGMP

Oben ist gezeigt worden, daß neben 3',5'-cGMP auch GDP und 2',3'-cGMP die DNA-Synthese in Milzzellen der Maus erhöht. Um die Spezifität der Stimulation für bestimmte Zellpopulationen zu untersuchen und mit den gefundenen Werten der mit 3',5'-cGMP aktivierten Zellen zu vergleichen, wurden BALB/c Milz-, Thymus-, Lymphknoten- und Knochenmarkzellen und Nude Milzzellen mit verschiedenen Dosen von GDP oder 2',3'-cGMP stimuliert.

Wie mit 3',5'-cGMP geben Nude Milzzellen die beste Antwort auf GDP (Abb. 10). Die Antwort auf GDP ist in BALB/c Milzzellen ebenfalls ähnlich wie die auf 3',5'-cGMP. Thymuszellen zeigen nur eine geringe Erhöhung der DNA-Synthese (von 17 ± 2 Ipm/Kultur in Kontrollkulturen auf 48 ± 3 Ipm/Kultur in Kulturen

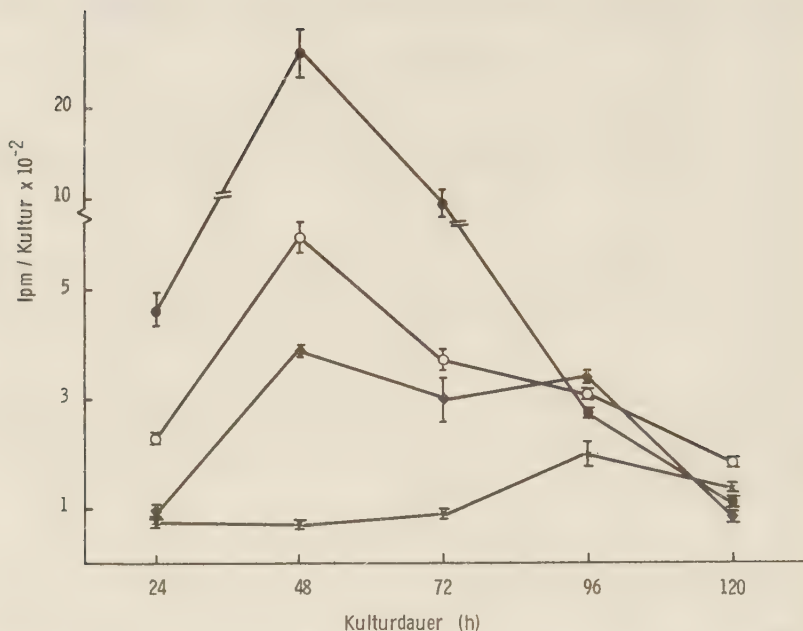


ABBILDUNG 9: Die Kinetik der Stimulierung von Lymphocyten durch 3',5'-cGMP, 2',3'-cGMP und GDP. BALB/c Milzzellen wurden mit optimalen Dosen von 3',5'-cGMP (5 mM), 2',3'-cGMP (1 mM) oder GDP (5 mM) stimuliert. Nach einer Kulturdauer von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, oder 120 h Dauer wurde der Thymidineinbau in Mikroturen bestimmt. (○) Zellkulturen mit 3',5'-cGMP; (●) Zellkulturen mit 2',3'-cGMP; (◆) Zellkulturen mit GDP, (★) Kontrollkulturen ohne Testsubstanz. Jeder Punkt ist als Mittelwert $\pm$ sam aus drei Kulturen angegeben.

mit GDP, bei einer optimalen Dosis von $5 \times 10^{-3} M$, und Lymphknoten-zellen zeigen keine Antwort. Obwohl GDP bei einer Konzentration von $3 \times 10^{-4} M$ oder $1 \times 10^{-3} M$ die DNA-Synthese in Knochenmarkzellen erhöht, wirken höhere Konzentrationen von GDP inhibierend.

Im Gegensatz zu 3',5'-cGMP und GDP stimuliert 2',3'-cGMP BALB/c Milzzellen bei weitem am stärksten von allen untersuchten Zellpopulationen. Die Antwort liegt in der Größenordnung, wie man sie nach einer Stimulierung mit PHA findet.

In dem hier gezeigten Versuch ist die DNA-Synthese um das 90-fache erhöht (Abb. 11). Die DNA-Synthese in Nude Milzzellen und BALB/c Knochenmarkzellen wird durch 2',3'-cGMP ebenfalls deutlich erhöht. In Thymuszellen ist die Erhöhung der DNA-Synthese gering. Im Gegensatz zu 3',5'-cGMP und GDP

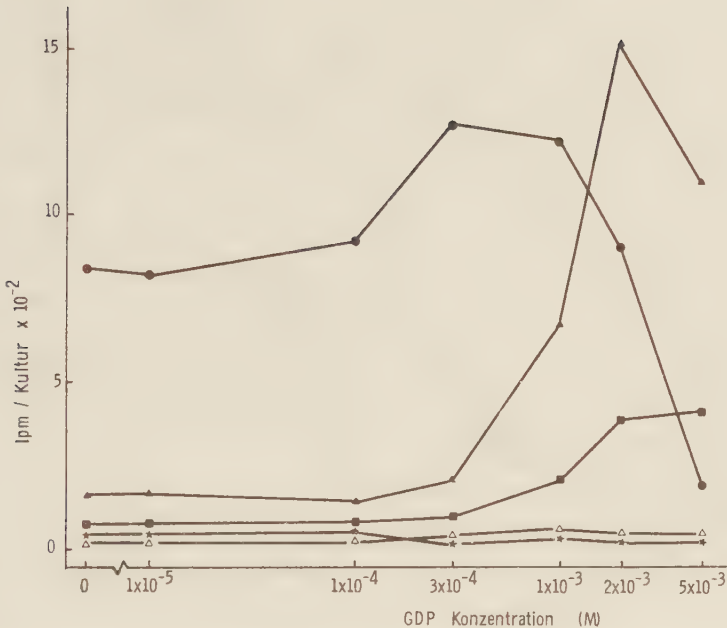


ABBILDUNG 10: Dosis Effekt Kurve der Stimulierung des Thymidineinbaus durch GDP in verschiedenen Lymphozytenpopulationen. BALB/c Milz-, Thymus-, Lymphknoten- oder Knochenmarkszellen oder Nude Milzzellen wurden in Mikrokulturen für 48 h in Medium mit verschiedenen Konzentrationen von GDP inkubiert. (■) BALB/c Milzzellkulturen; (△) BALB/c Thymuszellkulturen; (✱) BALB/c Lymphknoten- oder Knochenmarkszellen; (●) BALB/c Knochenmarkszellkulturen; (▲) Nude Milzzellkulturen. Der Thymidineinbau wurde in jeweils drei Kulturen bestimmt und daraus der Mittelwert berechnet. sam kleiner als 10%.

steigert 2',3'-cGMP als einziges der drei Nukleotide die DNA-Synthese in Lymphknoten- oder Knochenmarkszellen, wenn auch nur geringfügig.

3.2.6. Die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP und von ECTA auf die Stimulation von BALB/c Milzzellen durch 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP

Die Stimulierung von BALB/c Milzzellen durch optimale Dosen von LPS, PHA, 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP wurde durch Zugabe von verschiedenen Dosen von 3',5'-cAMP zum Kulturmedium inhibiert. Wie Abbildung 12 zeigt, bewirkt eine 3',5'-cAMP-Konzentration von ca. 1×10^{-4} M bis 3×10^{-4} M eine 50%ige Inhibierung der Stimulation durch LPS, PHA und 2',3'-cGMP. Für eine 50%ige Hemmung der Stimulation durch 3',5'-cGMP und GDP dagegen ist eine 3',5'-cAMP-

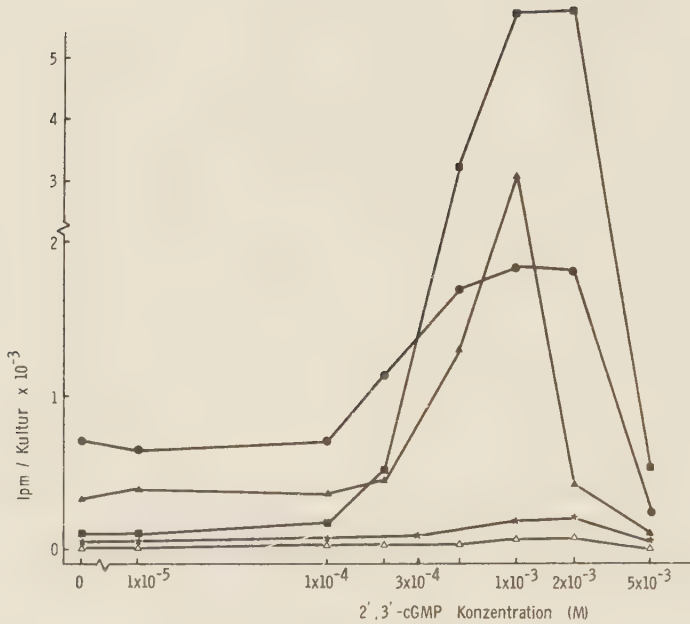


ABBILDUNG 11: Dosis Effekt Kurve der Stimulierung des Thymidineinbaus durch 2',3'-cGMP in verschiedenen Lymphozytenpopulationen. BALB/c Milz-, Thymus-, Lymphknoten-, oder Knochenmarkzellen oder Nude Milzzellen wurden in Mikrokultur mit verschiedenen Dosen von 2',3'-cGMP stimuliert. (■) BALB/c Milzzellkulturen; (△) BALB/c Thymuszellkulturen; (★) BALB/c Lymphknotenzellkulturen; (●) BALB/c Knochenmarkzellkulturen; (▲) Nude Milzzellkulturen. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h in jeweils drei Kulturen bestimmt und das arithmetische Mittel daraus berechnet. sam kleiner als 10%.

Konzentration von ca. $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ bis $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ notwendig.

Milzzellen wurden in Medium mit EGTA (0.6 mM) mit optimalen Dosen von 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP stimuliert. EGTA hemmt die Stimulierung durch diese Nukleotide, wie schon für die mitogene Stimulierung gezeigt wurde, vollständig. (Tab. 10). Diese Hemmung ist jedoch durch die Zugabe von CaCl_2 (0.6 mM) reversibel.

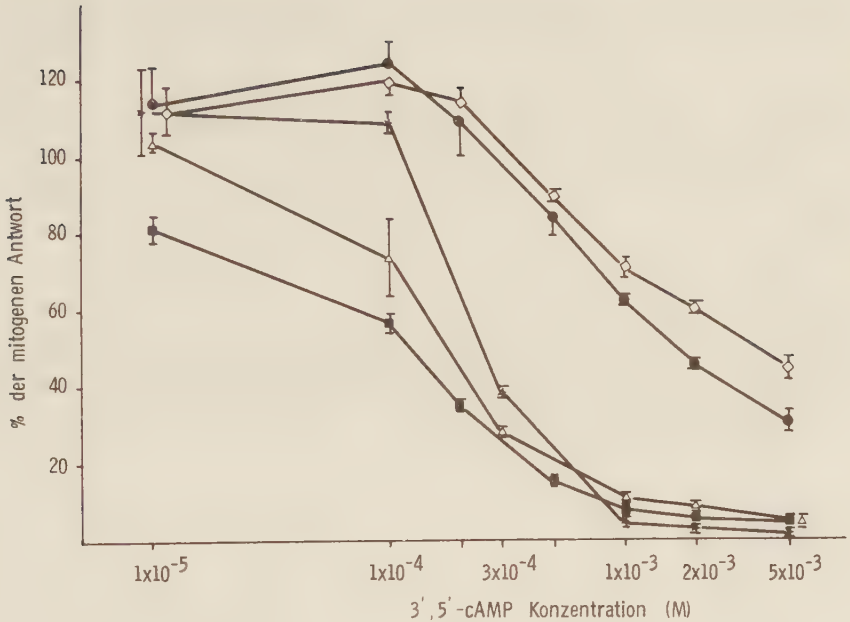


ABBILDUNG 12: Dosis Effekt Kurve der inhibierenden Wirkung von 3',5'-cAMP auf durch PHA-, LPS-, 3',5'-cGMP, 2',3'-cGMP- und GDP stimulierte Lymphozyten. BALB/c Milzzellen wurden mit optimalen Dosen von PHA (10 µg/ml), LPS (50 µg/ml), 3',5'-cGMP (5 mM), GDP (5 mM) und 2',3'-cGMP (1 mM) stimuliert. Zusammen mit diesen stimulierenden Substanzen wurden verschiedene Dosen von 3',5'-cAMP den Kulturen zugegeben. Der Thymidineinbau wurde nach einer Kulturdauer von 48 h bestimmt. (x) mit PHA stimulierte Kulturen; (Δ) mit LPS stimulierte Kulturen; (●) mit 3',5'-cGMP stimulierte Kulturen; (◇) mit GDP stimulierte Kulturen; (■) mit 2',3'-cGMP stimulierte Kulturen. Die Ergebnisse sind als % der mitogenen Antwort angegeben. Jeder Punkt zeigt den Mittelwert + s aus drei Mikro-Kulturen.

3.2.7. Stimulierung der Blastzelltransformation, Proliferation und des Thymidineinbaus in durch TCA fällbares Material

Die Problematik der Bestimmung des Thymidineinbaus als ein Maß für die DNA-Synthese ist oben bereits beschrieben worden. Um die gefundenen Ergebnisse abzusichern, wurden für die Bestimmung der Stimulationsrate der Lymphozyten durch 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP weitere Parameter herangezogen. In 72 h Kulturen von BALB/c Milzzellen wurden nach Zugabe von 3',5'-cGMP, GDP, 2',3'-cGMP, LPS oder PHA die Zahl der Blasten⁺, die Zahl der Colcemid-Meta-

⁺ Die Bestimmung der Blastzelltransformation wurde freundlicherweise von Frau Dr. Blitstein-Willinger durchgeführt.

TABELLE 10: Die Ca^{++} -Abhängigkeit der Stimulierung von Lymphozyten durch 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP

Kultur Medium	3',5'-cGMP (5 mM)	GDP (5 mM) Ipm/Kultur	2',3'-cGMP (1 mM)
ohne Zusatz	1180 $\pm$ 221	1349 $\pm$ 172	5725 $\pm$ 97
+ EGTA (0.6 mM)	15 $\pm$ 3	50 $\pm$ 6	45 $\pm$ 9
+ EGTA (0.6 mM) + CaCl_2 (0.6 mM)	840 $\pm$ 136	1264 $\pm$ 210	5890 $\pm$ 341

BALB/c Milzzellen wurden in Medium mit und ohne freiem Ca^{++} durch 3',5'-cGMP, GDP oder 2',3'-cGMP stimuliert. Der Thymidineinbau wurde in jeweils drei Mikroulturen nach einer Inkubationszeit von 48 h bestimmt. Die Werte sind als arithmetisches Mittel $\pm$ sam angegeben. Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz: 113 $\pm$ 20 Ipm/Kultur

phasen und die (^3H)TdR Einbaureate in dem TCA-Präzipitat der Lymphozyten (Makrokultur) bestimmt.

Mit Ausnahme der Stimulierung der Blasttransformation durch LPS verläuft die Stimulierung der Lymphozyten durch die getesteten Substanzen unter Zugrundeliegung aller drei getesteten Kriterien gleichartig (Tab. 11).

TABELLE 11: Die Stimulierung der Transformation, Proliferation und des Thymidineinbaus in das TCA-Präzipitat von Lymphozyten durch 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP.

Mitogen	Blasten %	Colcemid Metaphasen %	Thymidin- einbau Ipm/Kultur
3',5'-cGMP (5 mM)	10	2.5	1335 $\pm$ 45
GDP (5 mM)	10	3.0	940 $\pm$ 63
2',3'-cGMP (1 mM)	17	7.5	4317 $\pm$ 92
PHA (10 $\mu\text{g/ml}$)	26	13.1	11558 $\pm$ 165
LPS (50 $\mu\text{g/ml}$)	7	10.1	2361 $\pm$ 64
nihil	2	0.5	310 $\pm$ 5

Milzzellen von BALB/c Mäusen wurden mit den in der Tabelle angegebenen Substanzen stimuliert. Die Anzahl der Blastzellen, die Zahl der Colcemid-Metaphasen und der Thymidineinbau in das TCA-Präzipitat in jeweils drei Makro-Kulturen wurde nach einer Kulturdauer von 72 h bestimmt.

3.2.8. Die antagonistische Wirkung von 3',5'-cGMP und von GDP auf die durch 3',5'-cAMP verursachte Hemmung der mitogenen Stimulation

WATSON 1973 fand eine antagonistische Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP auf die antigene Stimulierung von Lymphozyten. Es sollte deshalb hier geprüft werden, ob dieser Effekt der beiden zyklischen Nukleotide auch bei der mitogenen Stimulierung in unserem System zur Wirkung kommt. Wir kultivierten BALB/c Milzzellen mit LPS in Gegenwart einer inhibierenden Dosis von 3',5'-cAMP und verschiedenen Dosen von 3',5'-cGMP.

Wie Abbildung 13 zeigt, kann 3',5'-cGMP bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ die durch 3',5'-cAMP ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) verursachte Hemmung der LPS-Antwort vollständig aufheben. Die Wirkung ist dosisabhängig; eine 3',5'-cGMP-Konzentration kleiner als $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ kann den Thymidineinbau nicht erhöhen.

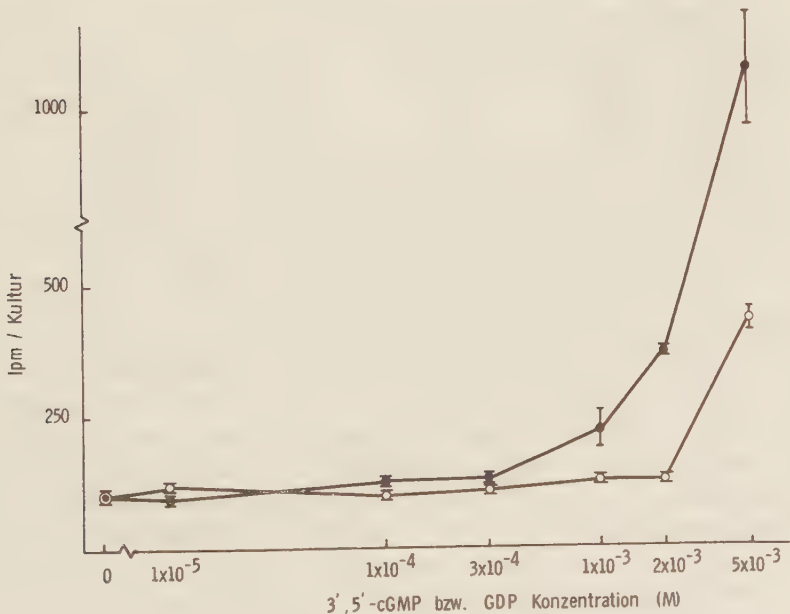


ABBILDUNG 13: Der Effekt von 3',5'-cGMP und GDP auf die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP in mit LPS stimulierten Milzzellkulturen. BALB/c Milzzellen wurden in Medium kultiviert, das neben LPS (50 µg/ml) und 3',5'-cAMP (1 mM) verschiedene Konzentrationen von 3',5'-cGMP oder GDP enthielt. Der Thymidineinbau in Mikro-kulturen wurde nach einer Kulturdauer von 48 h bestimmt. (●) 3',5'-cGMP wurde Zellkulturen zugegeben, die LPS und 3',5'-cAMP enthielten. (○) GDP wurde Zellkulturen zugegeben, die LPS und 3',5'-cAMP enthielten. Jeder Punkt ist als der Mittelwert ± sam aus drei Kulturen angegeben. LPS stimulierte Kulturen: 1261 ± 206 Ipm/Kultur. Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz: 82 ± 5 Ipm/Kultur.

GDP kann die durch 3',5'-cAMP verursachte Hemmung der Antwort auf LPS bei Lymphozyten zumindest teilweise aufheben (Abb. 13). Auch diese Wirkung ist dosisabhängig, aber schon eine Konzentration kleiner als $5 \times 10^{-3} M$ erhöht die DNA-Synthese in durch 3',5'-cAMP gehemmten Zellen nicht mehr.

Im Gegensatz zu 3',5'-cGMP und GDP kann 2',3'-cGMP die hemmende Wirkung von 3',5'-cAMP auf die Lymphozytenstimulierung durch LPS nicht wieder aufheben. (Tab. 12).

TABELLE 12: Das Fehlen einer antagonistischen Wirkung von 2',3'-cGMP und 3',5'-cAMP.

Testsubstanzen	Thymidineinbau Ipm/Kultur	StR
LPS (50 µg/ml)	1224 $\pm$ 87	19.7
LPS (50 µg/ml) +3',5'-cAMP (1 mM)	65 $\pm$ 7	1.0
LPS (50 µg/ml) +3',5'-cAMP (1 mM) +3',5'-cGMP (5 mM)	1118 $\pm$ 41	18.0
LPS (50 µg/ml) +3',5'-cAMP (1 mM) +2',3'-cGMP (1 mM)	163 $\pm$ 2	2.6
nihil	62 $\pm$ 6	1.0

BALB/c Milzzellen wurden in Medium mit den in der Tabelle angegebenen Substanzen kultiviert. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h bestimmt. Jeder Wert gilt das Mittel $\pm$ sam aus drei Mikrokulturen an.

Die antagonistische Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP wird nicht nur in mit LPS stimulierten Milzzellen gefunden. Sowohl in BALB/c Milz-, Thymus- und Knochenmarkszellkulturen als auch in Nude Milzzellkulturen, die durch die verschiedenen T- und B-Zell-Mitogene stimuliert wurden, wurde die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP durch 3',5'-cGMP zumindest teilweise aufgehoben (Abb. 14). Es existieren allerdings quantitative Unterschiede sowohl hinsichtlich der Hemmung der mitogenen Stimulierung (siehe auch Abb. 8) als auch hinsichtlich der Aufhebung dieser Hemmung durch 3',5'-cGMP. Läßt man die Reaktion der mit Con A stimulierten Thymuszellen außer acht, ist der Effekt von 3',5'-cGMP stärker in den Fällen, bei denen 3',5'-cAMP schwächer wirkt.

Nicht nur 3',5'-cGMP, auch GDP zeigt einen antagonistischen Effekt auf 3',5'-cAMP in fast allen getesteten Lymphozytenpopulationen. Er ist jedoch überall geringer als die Wirkung von 3',5'-cGMP.

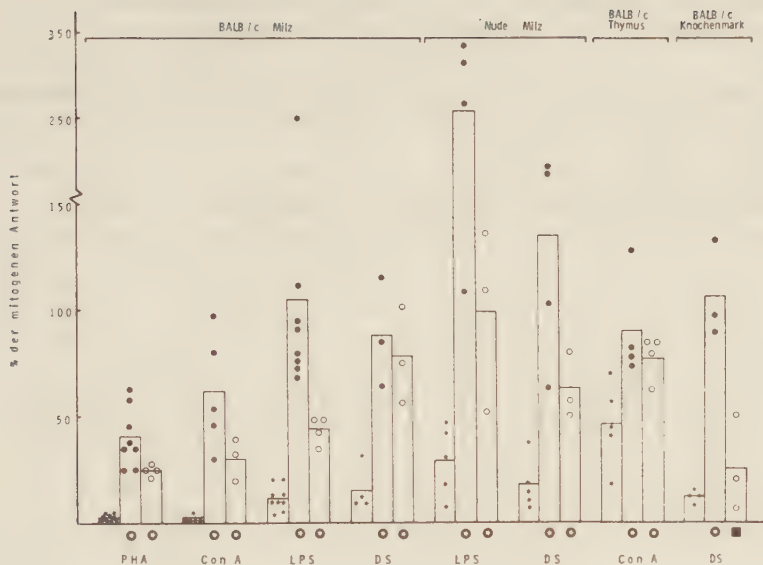


ABBILDUNG 14: Die antagonistische Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP und von 3',5'-cAMP und GDP in verschiedenen Lymphozytenpopulationen. Milz-, Thymus- oder Knochenmarkzellen von BALB/c Mäusen oder Milzzellen von Nude Mäusen wurden mit PHA (10, $\mu\text{g/ml}$), Con A (5, $\mu\text{g/ml}$), LPS (50, $\mu\text{g/ml}$) oder DS (50, $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Das jeweilige Mitogen wurde entweder zusammen mit 3',5'-cAMP (1 mM), oder 3',5'-cAMP (1 mM) und 3',5'-cGMP (5 mM), oder 3',5'-cAMP (1 mM) und GDP (2 mM) den Kulturen zugesetzt. In BALB/c Milzzellkulturen wurde GDP in einer Konzentration von 5 mM zusammen mit dem Mitogen und 3',5'-cAMP (1 mM) zugegeben. Nach 48 h in Mikrokultur wurde der Thymidineinbau bestimmt. (★) Zellkulturen mit dem jeweiligen Mitogen und 3',5'-cAMP; (●) Zellkulturen mit dem jeweiligen Mitogen, 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP; (○) Zellkulturen mit dem jeweiligen Mitogen, 3',5'-cAMP und GDP. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus jeweils drei Kulturen in einem Versuchsansatz. Alle Versuchsansätze wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Die Balken geben die Mittelwerte aus allen Kulturen an. Für die statistische Auswertung wurde der t-Test angewandt. Es wurden jeweils die Kulturen der Gruppe (Mitogen + 3',5'-cAMP) mit den Kulturen der Gruppen (Mitogen + 3',5'-cAMP + 3',5'-cGMP) bzw. (Mitogen + 3',5'-cAMP + GDP) verglichen. (★) $p \leq 0.05$; (■) $p > 0.05$. Bei einem $p \leq 0.05$ wird die Differenz zwischen beiden Gruppen als signifikant angesehen.

Die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP auf die Antwort von Knochenmarkszellen auf DS kann durch GDP auch nicht teilweise aufgehoben werden. Dieses Fehlen einer antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und GDP in Knochenmarkszellen ist möglicherweise auf die inhibierende Wirkung von GDP in diesen Zellen, die schon in Figur 10 gezeigt wurde, zurückzuführen.

3.2.9. Die Kinetik der Hemmung durch 3',5'-cAMP und der dazu antagonistischen Wirkung von 3',5'-cGMP

3',5'-cAMP wurde zu verschiedenen Zeiten nach Stimulierung von BALB/c Milzzellen mit LPS den Kulturen zugesetzt. Die Hemmung durch 3',5'-cAMP ist nahezu linear abhängig von dem Zeitpunkt der Zugabe (Abb. 15). 28 h nach

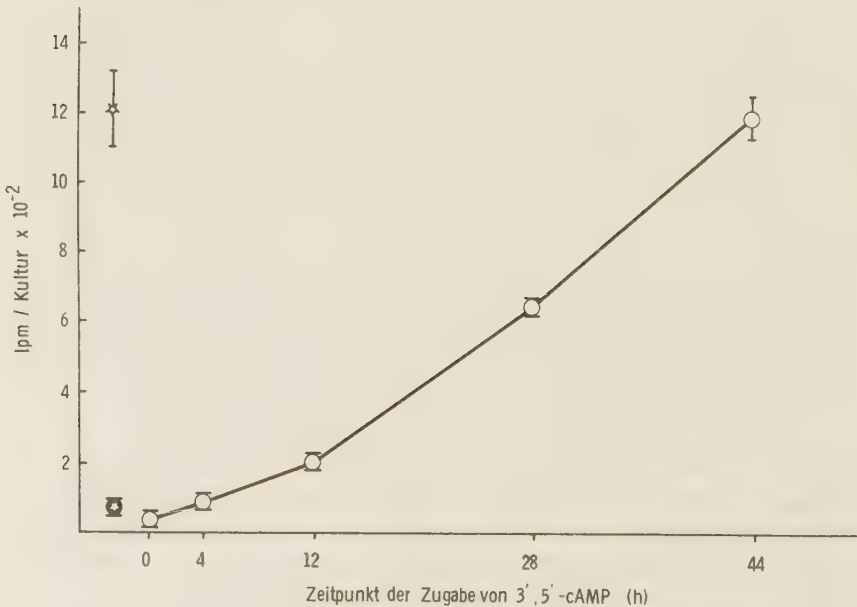


ABBILDUNG 15: Die Kinetik der hemmenden Wirkung von 3',5'-cAMP. BALB/c Milzzellen wurden mit LPS (50 µg/ml) stimuliert. Verschiedene Zeiten nach Beginn wurde 3',5'-cAMP (1 mM) den mit LPS stimulierten Kulturen zugegeben. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h in jeweils drei Kulturen bestimmt (○) 3',5'-cAMP wurde zu verschiedenen Zeiten den mit LPS stimulierten Kulturen zugegeben; (☆) LPS stimulierte Kulturen; (✱) Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz. Jeder Punkt ist das arithmetische Mittel ± sam.

dem Start der Kultur mit LPS zugegeben, hemmt 3',5'-cAMP die Antwort auf LPS noch um nahezu 50%. Gleichzeitig mit dem (^3H)TdR 4 h vor Kulturrende zugegeben, vermag 3',5'-cAMP den Thymidineinbau in die mit LPS stimulierten Zellen nicht mehr zu inhibieren. Anders dagegen ist die Kinetik der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP. Wird letzteres 7 - 8 h nach dem Start der Kulturen mit einem Mitogen (PHA oder LPS) und 3',5'-cAMP zugegeben, hat es nur noch 50% der maximalen Wirksamkeit, und 12 h nach Kulturbeginn vermag es den Thymidineinbau nur noch gering zu erhöhen (Abb. 16).

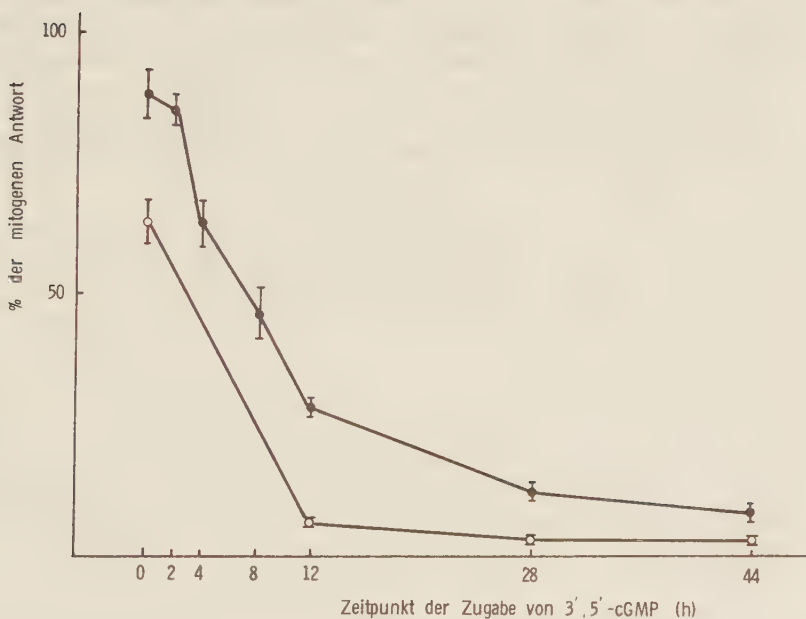


ABBILDUNG 16: Die Kinetik der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP. Milzzellen von BALB/c Mäusen wurden in Mikrookulturen inkubiert. (●) LPS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 3',5'-cAMP (1 mM) oder (○) PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 3',5'-cAMP (1 mM) wurde zu Beginn den Kulturen zugegeben. Zu verschiedenen Zeiten nach diesem Start wurde 3',5'-cGMP (5 mM) zugesetzt. Nach einer Kulturzeit von 48 h wurde der Thymidineinbau bestimmt. Jeder Punkt ist als der Mittelwert $\pm$ sam aus jeweils drei Kulturen angegeben. Der Thymidineinbau war in LPS stimulierten Kulturen 1212 ± 110 Ipm/Kultur, in PHA stimulierten Kulturen 5722 ± 213 Ipm/Kultur und in Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz 77 ± 4 Ipm/Kultur.

3.2.10. Die Spezifität der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP

In den Tabellen 7a, b, c und 9b ist gezeigt worden, daß neben 3',5'-cAMP auch andere Nukleotide und Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von zyklischen Nukleotiden verändern können, die mitogene Stimulierung hemmen. Da wir die Spezifität der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP untersuchen wollen, haben wir getestet, ob 3',5'-cGMP die hemmende Wirkung nicht nur von 3',5'-cAMP, sondern auch die von anderen Nukleotiden und die von Papaverin, Theophyllin und PG E₂ aufzuheben vermag. Die Ergebnisse zeigen, daß 3',5'-cGMP nur die durch 3',5'-cAMP verursachte Hemmung der mitogenen Stimulierung wieder aufheben kann (Tab. 13). In mit LPS stimulierten Kulturen, die durch AR, nicht-zyklische Adenosin-Nukleotide, 2',3'-cAMP oder durch 3',5'-cAMP-Derivate gehemmt worden sind, ist 3',5'-cGMP wirkungslos. Auch auf die hemmende Wirkung von Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von 3',5'-cAMP erhöhen, ist 3',5'-cGMP ohne Wirkung.

TABELLE 13: Die Spezifität der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP.

Hemmer		LPS % der LPS Antwort	LPS +3',5'-cGMP
3',5'-cAMP	(1 mM)	10 ± 1	95 ± 15
AR	(1 mM)	6 ± 1	10 ± 2
AMP	(0.5 mM)	6 ± 1	9 ± 1
ADP	(0.5 mM)	7 ± 1	9 ± 1
ATP	(0.5 mM)	6 ± 1	8 ± 1
2',3'-cAMP	(10 mM)	17 ± 2	23 ± 3
8Br-cAMP	(5 mM)	15 ± 1	4 ± 1
db-cAMP	(1 mM)	2 ± 1	2 ± 1
Papaverin	(10 µM)	16 ± 1	6 ± 1
Theophyllin	(1 mM)	7 ± 1	2 ± 1
PG E ₂	(200 µg/ml)	44 ± 1	28 ± 1

BALB/c Milzzellen wurden zusammen mit LPS (50 µg/ml) und den in der Tabelle angegebenen Hemmern inkubiert. Gleichzeitig mit LPS und einem dieser Hemmer wurde 3',5'-cGMP (5 mM) den Kulturen zugegeben. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h in Mikroturen bestimmt. Jeder Wert ist als Mittel ± sam aus drei Kulturen angegeben. LPS stimulierte Milzzellen: 1482 ± 96 Ipm/Kultur; Kontroll-Kulturen : 120 ± 16 Ipm/Kultur.

3.2.11. Die makrophagenabhängige Stimulierung der Lymphozyten durch 3',5'-cGMP und GDP

Um Zellpopulationen größerer Homogenität zu erhalten, als die Zellsuspension der Milz üblicherweise liefert, wurden von diesen Zellen über eine Glasperlen-Säule, Nylonwolle-Säule oder durch Behandlung mit LSR die adhärenenten bzw. phagozytierenden Zellen abgetrennt und die Stimulierbarkeit der DNA-Synthese in diesen gereinigten Zellpopulationen durch 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP untersucht.

Milzzellen, die mit Hilfe einer Glasperlensäule von adhärenenten Zellen gereinigt worden sind, zeigen eine wesentlich geringere Stimulierbarkeit durch 3',5'-cGMP und GDP als die ursprüngliche Zellpopulation. Die Antwort ist dabei auf 30% bzw. 20% erniedrigt. Die Antwort auf LPS und 2',3'-cGMP ist jedoch nur auf 84% bzw. 75% gesunken (Tab. 14). Die Reaktion auf PHA dagegen wird durch das Fehlen der adhärenenten Zellen sogar um 30% erhöht.

TABELLE 14: Die mitogene Stimulierung von Milzzellen, die nicht an einer Glasperlen-Säule adhärieren.

Mitogen	Milz	na Milz	na Milz + 5% PZ	na Milz + 10% PZ
	Ipm/Kultur			
PHA	4262 $\pm$ 396	5487 $\pm$ 71	16038 $\pm$ 1703	16066 $\pm$ 1345
LPS	974 $\pm$ 38	818 $\pm$ 44	1250 $\pm$ 15	1197 $\pm$ 117
2',3'-cGMP	3187 $\pm$ 289	2379 $\pm$ 57	2621 $\pm$ 145	3537 $\pm$ 44
3',5'-cGMP	1191 $\pm$ 32	238 $\pm$ 14	1234 $\pm$ 75	1839 $\pm$ 31
GDP	644 $\pm$ 18	206 $\pm$ 4	1020 $\pm$ 66	1471 $\pm$ 62
nihil	119 $\pm$ 6	79 $\pm$ 6	357 $\pm$ 16	377 $\pm$ 6

BALB/c Milzzellen wurden über eine Glasperlen-Säule aufgetrennt. Die Zellen des Eluats einer solchen Säule (na Milz) wurden mit und ohne Zusatz von 5% bzw. 10% PZ syngener Mäuse mit PHA (10 μ g/ml), LPS (50 μ g/ml), 2',3'-cGMP (1 mM), 3',5'-cGMP (5 mM) oder GDP (5 mM) stimuliert. Nach 48 h in Mikrokultur wurde der Thymidineinbau bestimmt. Jeder Wert gibt das Mittel $\pm$ sam aus jeweils drei Mikrokulturen an.

Eine Zugabe von 5% oder 10% PZ (die zum größten Teil aus Makrophagen bestehen) zu diesen nicht-adhärenenten Zellen erhöht die Thymidineinbaurrate in mit 3',5'-cGMP und GDP stimulierten Zellen sogar über den ursprünglich erhaltenen Wert hinaus. Mit LPS und 2',3'-cGMP stimulierte nicht-adhärenente Zellen zeigen nur eine schwache Erhöhung der DNA-Synthese durch die Zugabe der PZ. Obwohl die DNA-Synthese in mit PHA stimulierten Zellen durch das Fehlen von adhärenenten Zellen erhöht worden ist, wird durch die Zugabe von PZ die Stimulierung durch PHA in diesen Populationen um das 3fache erhöht.

Die Passage der Milzzellpopulation durch eine Nylonwolle-Säule liefert eine Zellpopulation, die nicht nur arm an Makrophagen, sondern auch arm an B-Zellen ist (JULIUS et al. 1973). Eine Stimulierung einer solchen Zellpopulation kann demnach Ergebnisse über die Zielzelle der Wirkung von 3',5'-cGMP, GDP und 2',3'-cGMP innerhalb der Milzzellen liefern.

Die Stimulierung der DNA-Synthese dieser Milzzellen durch PHA wird durch das Fehlen der an Nylonwolle adhärierenden Zellen nicht beeinflusst (Tab. 15). 3',5'-cGMP, GDP, 2',3'-cGMP und LPS dagegen zeigen keine oder nur eine schwache Antwort (maximal 2fach). Die Zugabe von 5% bzw. 10% PZ erhöht die Antwort auf PHA wieder um das 3fache, von ca. 3300 Ipm/Kultur auf ca. 11000 Ipm/Kultur. Die Antwort der nicht-adhärenenten Milzzellen auf 3',5'-cGMP und GDP wird durch die Zugabe von PZ fast in der ursprünglichen Höhe wieder hergestellt.

TABELLE 15: Die mitogene Stimulierung von Milzzellen, die nicht an einer Nylonwolle-Säule adhärieren.

Mitogen	Milz	na Milz	na Milz + 5% PZ	na Milz + 10% PZ
		Ipm/Kultur		
PHA	3411 ± 454	3291 ± 164	10175 ± 988	10960 ± 837
LPS	397 ± 18	15 ± 1	48 ± 2	59 ± 4
2',3'-cGMP	2397 ± 196	28 ± 1	240 ± 10	323 ± 21
3',5'-cGMP	780 ± 157	28 ± 1	252 ± 35	555 ± 54
GDP	308 ± 5	18 ± 4	213 ± 2	275 ± 23
nihil	48 ± 3	14 ± 2	22 ± 2	25 ± 2

Milzzellen von BALB/c Mäusen wurden über eine Nylonwolle-Säule aufgetrennt. Die nichtadhärente Milzzellpopulation (na Milz) wurde mit und ohne Zusatz von 5% bzw. 10% PZ syngener Mäuse mit PHA (10 µg/ml), LPS (50 µg/ml), 2',3'-cGMP (1 mM), 3',5'-cGMP (5 mM) oder GDP (5 mM) stimuliert. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h Inkubationszeit in Mikroturen bestimmt. Jeder Wert gibt das Mittel ± sam aus jeweils drei Kulturen an.

Die Stimulierung der nicht-adhärenenten Milzzellen durch LPS nach einem Zusatz von PZ ist nur schwach, und auch durch 2',3'-cGMP wird bei weitem nicht die Antwort der ursprünglichen Milzzellpopulation erreicht. Die Stimulierung in dieser mit PZ angereicherten nicht-adhärenenten Milzzellpopulation durch 2',3'-cGMP liegt in einer Größenordnung, wie sie durch 3',5'-cGMP bzw. GDP erreicht wird.

Die Antwort von Thymuszellen auf mitogene Stimulierung mit 3',5'-cGMP, 2',3'-cGMP und LPS ist unwesentlich, auf Stimulierung mit GDP und PHA nur gering. Von allen getesteten Mitogenen ist Con A das Einzige, das eine hohe

Antwort in Thymuszellen hervorruft (Tab. 16). Nach einer Zugabe von 5% bzw. 10% PZ zu den Thymuszellkulturen findet man in dieser gemischten Zellpopulation eine wesentlich gesteigerte Antwort der Zellen auf PHA, 2',3'-cGMP, 3',5'-cGMP und GDP. Die Antwort auf LPS wird dagegen wenig erhöht. Im Gegensatz zu diesen Mitogenen wird die Antwort auf Con A durch den Zusatz der PZ zu den Thymuszellkulturen deutlich erniedrigt.

TABELLE 16: Die Wirkung von PZ auf die mitogene Stimulierung von Thymuszellen.

Mitogen	Thymus ohne PZ	Thymus + 5% PZ Ipm/Kultur	Thymus + 10% PZ
Con A	4006 $\pm$ 82	3369 $\pm$ 20	2649 $\pm$ 209
PHA	224 $\pm$ 20	446 $\pm$ 50	493 $\pm$ 28
LPS	64 $\pm$ 4	113 $\pm$ 2	178 $\pm$ 55
2',3'-cGMP	73 $\pm$ 1	273 $\pm$ 18	447 $\pm$ 16
3',5'-cGMP	57 $\pm$ 1	240 $\pm$ 6	546 $\pm$ 59
GDP	121 $\pm$ 8	251 $\pm$ 23	463 $\pm$ 65
nihil	48 $\pm$ 3	42 $\pm$ 2	52 $\pm$ 2

BALB/c Thymuszellen wurden mit oder ohne Zusatz von 5% bzw. 10% syngener PZ mit Con A (5 μ g/ml), PHA (10 μ g/ml), LPS (50 μ g/ml), 2',3'-cGMP (1 mM), 3',5'-cGMP (5 mM) oder GDP (5 mM) stimuliert. Die Kulturen wurden zur Bestimmung des Thymidineinbaus 48 h kultiviert. Die Ergebnisse geben die Mittelwerte $\pm$ sam aus jeweils drei Mikro-Kulturen an.

Die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP ist offensichtlich nicht von Makrophagen abhängig. Nach Inhibierung der PHA-Stimulation durch 3',5'-cAMP ist die Antwort in der ursprünglichen Milzzellpopulation ebenso niedrig wie in nicht-adhärenenten Milzzellen mit und ohne Zusatz von PZ (Tab. 17).

Die Wirkung von 3',5'-cGMP auf den inhibierenden Effekt von 3',5'-cAMP in einer nicht-adhärenenten Milzzellpopulation ist zwar verringert (Tab. 17). Ein Zusatz von 10% PZ vermindert diese antagonistische Wirkung von 3',5'-cGMP aber noch weiter, obwohl sowohl die Antwort auf PHA als auch die Antwort auf 3',5'-cGMP durch diesen Zusatz von PZ zu der nicht-adhärenenten Milzzellpopulation erhöht ist.

Ein ähnliches Ergebnis erhält man mit einer Zellpopulation, die aus nicht phagozytierenden Milzzellen besteht (Tab. 18).

Da wir prüfen wollten, ob die in Tabellen 14 - 18 gefundene Erhöhung der DNA-Syntheserate durch die Zugabe von PZ in den PZ selbst stattgefunden hat, wurden PZ in Gegenwart von LPS, PHA, 2',3'-cGMP, 3',5'-cGMP und GDP inkubiert. LPS, PHA und 2',3'-cGMP zeigen nur einen sehr geringen Effekt auf die DNA-Synthese

TABELLE 17: Die antagonistische Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP auf die PHA-Stimulierung von nichtadhärenten Milzzellen mit und ohne Zusatz von PZ.

Testsubstanz	Milz	na Milz Ipm/Kultur	na Milz + 10% PZ
PHA	6467 $\pm$ 558	7376 $\pm$ 664	15077 $\pm$ 1182
3',5'-cGMP	578 $\pm$ 22	203 $\pm$ 5	532 $\pm$ 25
PHA + 3',5'-cAMP	47 $\pm$ 4	55 $\pm$ 7	44 $\pm$ 1
PHA + 3',5'-cAMP +3',5'-cGMP	2259 $\pm$ 32	1498 $\pm$ 76	1009 $\pm$ 67
nihil	158 $\pm$ 8	68 $\pm$ 3	134 $\pm$ 6

BALB/c Milzzellen wurden über eine Glasperlen-Säule aufgetrennt. Die nichtadherenten Milzzellen (na Milz) wurden mit oder ohne Zusatz von 10% syngener PZ wie in der Tabelle angegeben in Mikrokultur inkubiert. PHA: 10 µg/ml; 3',5'-cAMP: 1 mM; 3',5'-cGMP: 5 mM. Nach einer Kulturzeit von 48 h wurde der Thymidineinbau bestimmt. Jedes Ergebnis zeigt den Mittelwert $\pm$ sam aus drei Kulturen.

TABELLE 18: Die antagonistische Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP auf die PHA-Stimulierung von nichtphagozytierenden Milzzellen mit und ohne Zusatz von PZ.

Testsubstanz	Milz	nph Milz Ipm/Kultur	nph Milz + 10% PZ
PHA	2234 $\pm$ 34	3041 $\pm$ 248	4129 $\pm$ 236
3',5'-cGMP	552 $\pm$ 9	226 $\pm$ 13	1121 $\pm$ 138
PHA + 3',5'-cAMP	33 $\pm$ 3	28 $\pm$ 2	26 $\pm$ 3
PHA + 3',5'-cAMP +3',5'-cGMP	784 $\pm$ 31	529 $\pm$ 34	185 $\pm$ 13
nihil	91 $\pm$ 5	57 $\pm$ 4	103 $\pm$ 6

Aus BALB/c Milzzellen wurden durch Behandlung mit LSR die phagozytierenden Zellen abgetrennt. Die nichtphagozytierenden Milzzellen (nph Milz) wurden mit und ohne Zusatz von 10% syngener Milzzellen wie in der Tabelle angegeben inkubiert. PHA: 10 µg/ml; 3',5'-cAMP: 1 mM; 3',5'-cGMP: 5 mM. Die Zellen wurden für 48 h in Mikrokultur gehalten und der Thymidineinbau bestimmt. Jeder Wert ist als das arithmetische Mittel $\pm$ sam aus drei Kulturen angegeben.

der PZ (Tab. 19). Nur 3',5'-cGMP und GDP zeigen eine deutliche Stimulierung des Thymidineinbaus in PZ. Jedoch ist leicht zu errechnen, daß diese Stimulierung nicht verantwortlich sein kann für die Erhöhung der DNA-Synthese durch Zugabe von 10% zu nichtadhärenten, nicht-phagozytierenden oder Thymuszellen, da der Thymidineinbau in PZ-Kulturen mit 3',5'-cGMP maximal 57 Ipm/ 3×10^4 PZ beträgt.

TABELLE 19: Die mitogene Stimulierung des Thymidineinbaus in PZ.

Mitogen	Thymidineinbau	
	Ipm/Kultur	StR
LPS (50 μ g/ml)	87 $\pm$ 3	2.2
PHA (10 μ g/ml)	76 $\pm$ 8	1.9
2',3'-cGMP (1 mM)	56 $\pm$ 1	1.4
3',5'-cGMP (5 mM)	572 $\pm$ 16	14.3
GDP (5 mM)	242 $\pm$ 6	6.1
nihil	40 $\pm$ 1	1.0

PZ von BALB/c Mäusen wurden in Medium mit den in der Tabelle angegebenen Substanzen in Mikro-Kulturen inkubiert. Nach einer Kulturzeit von 48 h wurde der Thymidineinbau in jeweils drei Kulturen bestimmt. Jeder Wert gibt das arithmetische Mittel $\pm$ sam an.

3.3 Die Stimulierung der Produktion von löslichen Faktoren (LAF und LIF) in PZ-Kulturen

3.3.1. Der Effekt von SUP aus PZ-Kulturen auf die DNA-Synthese in Thymuszellen

Im vorigen Kapitel ist gezeigt worden, daß die Stimulierung von Lymphozyten durch 3',5'-cGMP und GDP makrophagenabhängig ist. Die Wirkung der Makrophagen kann nun entweder durch einen direkten Zell-zu-Zell-Kontakt erklärt werden oder durch lösliche Faktoren, die von den Makrophagen abgegeben werden. Um die letztere Möglichkeit zu prüfen, wurden PZ in Gegenwart verschiedener Nukleotide, Mitogene und Acetylcholin kultiviert. Anschließend wurden Thymuszellen in 10% des SUP von diesen PZ-Kulturen inkubiert und der Thymidineinbau nach einer Kulturdauer von 48 h bestimmt.

SUP von PZ-Kulturen inkubiert mit 3',5'-cGMP oder GDP erhöht die DNA-Synthese in Thymuszellen bis auf das 15fache (Abb. 17). Der Überstand dieser PZ-Kulturen besitzt also Eigenschaften, die die DNA-Synthese von Lymphozyten aktivieren. Das weist auf die Existenz eines entsprechenden Faktors (Lymphozyten aktivierender Faktor, LAF) hin.

In den Überständen von PZ-Kulturen mit 2',3'-cGMP, 3',5'-cAMP, GMP, GTP, LPS, PHA, Acetylcholin und PG F_{2 α} und in PZ-Kulturen ohne Testsubstanz konnte in den hier durchgeführten Versuchen keine LAF-Aktivität festgestellt werden (Tab. 17).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Stimulierung von Lymphozyten durch 3',5'-cGMP und GDP zumindest teilweise durch einen löslichen Faktor aus Makrophagen vermittelt wird.

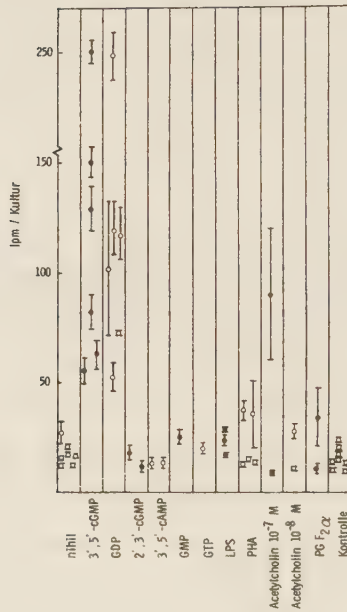


ABBILDUNG 17: Die Aktivität von SUP aus PZ-Kulturen auf den Thymidineinbau in Thymuszellen. PZ von BALB/c Mäusen wurden in einem Volumen von 1 ml für 24 h kultiviert. Das Kulturmedium enthielt neben 5% inaktivierten HS die in der Figur angeführten Substanzen. Zur Bestimmung der LAF Aktivität wurden BALB/c Thymuszellen in Medium mit 10% des jeweiligen Überstandes für 48 h kultiviert und der Thymidineinbau bestimmt. Jeder Punkt gibt den Mittelwert $\pm$ sam aus jeweils drei Mikrokulturen in einem Versuchsansatz an. Alle Versuchsansätze wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Kontroll-Kulturen: Thymuszell-Kulturen in Medium ohne Überstand aus PZ-Kulturen.

3.3.2. Verschiedene Bedingungen für die Sekretion von LAF und für die Bestimmung der LAF-Aktivität

In einführenden Experimenten sollten günstige Bedingungen für die LAF-Produktion und für die Bestimmung der LAF-Aktivität gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Tabellen 20 - 23 zusammengefaßt.

In mit Na-Thioglycolat oder Proteose-Pepton aktivierten PZ ist die durch 3',5'-cGMP stimulierte LAF-Produktion nur sehr gering, so daß die normalen (nicht aktivierten) PZ die geeignetere Zellpopulation ist (Tab. 20).

TABELLE 20: Die LAF-Aktivität in Kulturüberständen von induzierten exudat Peritoneal-Zellen.

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in Thymuszellkulturen Ipm/Kultur
NaTh-PZ	23 $\pm$ 2
NaTh-PZ + 3',5'-cGMP	39 $\pm$ 5
PP-PZ	23 $\pm$ 1
PP-PZ + 3',5'-cGMP	29 $\pm$ 2
PZ	14 $\pm$ 6
PZ + 3',5'-cGMP	79 $\pm$ 8
nihil	21 $\pm$ 3

BALB/c Mäusen wurde i.p. 1.5 ml einer 0.5% Na-Thioglycolat Lösung oder 1.5 ml einer 10% Proteose-Pepton -Lösung injiziert. Nach 4 Tagen wurden die PZ geerntet. NaTh-PZ: mit Na-Thioglycolat induzierte PZ; PP-PZ: mit Proteose-Pepton induzierte PZ. Die Zellen wurden für 24 h in Medium mit 3',5'-cGMP (5 mM) kultiviert (Primär-Kultur). PZ-Kulturbedingungen und Bestimmung der LAF-Aktivität siehe Legende Abb. 17. Jeder Wert gibt das Mittel $\pm$ sam aus drei Thymuszellkulturen an.

TABELLE 21: Das Fehlen einer Wirkung von Serum auf die LAF-Produktion

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in Thymuszellkulturen Ipm/Kultur
PZ + Serum + 3',5'-cGMP	148 $\pm$ 6
PZ + 3',5'-cGMP	153 $\pm$ 34
PZ + Serum	17 $\pm$ 1
PZ	14 $\pm$ 2

PZ von BALB/c Mäusen wurden in Medium mit oder ohne 5% inaktiviertem HS kultiviert (Primär-Kultur) und die Wirkung von 3',5'-cGMP (5 mM) auf die LAF Produktion geprüft. Die PZ Kulturen und die Bestimmung der LAF Aktivität wurden durchgeführt wie in Abb. 17 beschrieben. Jeder Wert ist als das Mittel $\pm$ sam aus drei Thymuszellkulturen angegeben.

Die Produktion von LAF ist nicht von der Anwesenheit von Serum im Kulturmedium abhängig (Tab. 21). Es wurde deshalb in den späteren Versuchen auf das Serum verzichtet.

Nicht nur Thymuszellen, sondern auch Millzzellen lassen sich durch den SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen aktivieren (Tab. 22).

TABELLE 22: Die Wirkung von SUP aus PZ-Kulturen auf den Thymidineinbau in Milzzellen

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in Milzzellkulturen	
	Exp. I	Exp. II
	Ipm/Kultur	
PZ + 3',5'-cGMP	202 $\pm$ 16	584 $\pm$ 12
PZ	65 $\pm$ 6	103 $\pm$ 9
nihil	68 $\pm$ 5	96 $\pm$ 4

PZ von BALB/c Mäusen wurden in Kulturmedium mit oder ohne 3',5'-cGMP wie in Legende Figur 17 beschrieben kultiviert. Zur Bestimmung der LAF-Aktivität wurde der Thymidineinbau in syngeneten Milzzellkulturen bestimmt. Die Tabelle gibt die Ergebnisse zweier voneinander unabhängig durchgeführter Versuchsansätze wieder. Jeder Wert ist als das Mittel $\pm$ sam aus drei Milzzellkulturen angegeben.

TABELLE 23: Die Wirkung von LAF auf mit Con A und PHA stimulierte Thymuszellen

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in Thymuszellkulturen mit					
	Con A		PHA		ohne Mitogen	
	Ipm/Kultur	PR	Ipm/Kultur	PR	Ipm/Kultur	PR
PZ + 3',5'-cGMP	3888 $\pm$ 129	1.7	570 $\pm$ 78	4.3	63 $\pm$ 7	2.3
PZ	2233 $\pm$ 84	1.0	132 $\pm$ 2	1.0	27 $\pm$ 5	1.0
ohne SUP	2276 $\pm$ 73	-	61 $\pm$ 9	-	14 $\pm$ 1	-

PZ von BALB/c Mäusen wurden unter Bedingungen wie in Tabelle 20 beschrieben kultiviert. Die LAF-Aktivität wurde in BALB/c Thymuszellkulturen bestimmt, die jeweils 10% SUP der jeweiligen PZ-Kulturen und Con A (5 μ g/ml) oder PHA (10 μ g/ml) oder kein Mitogen enthielten. Der Thymidineinbau wurde in jeweils drei Mikro-Kulturen nach einer Kulturzeit von 48 h bestimmt.

LAF erhöht die DNA-Synthese in unstimulierten und in mit Con A stimulierten Thymuszellen (Tab. 23). Die Erhöhung durch LAF in mit Con A stimulierten Zellen ist allerdings im Verhältnis zu den Kontrollkulturen nur gering. Die deutlichsten stimulierenden Effekte von LAF fanden wir in mit PHA stimulierten Thymuszellen. Wir benutzten deshalb in den weiteren Versuchen für die Bestimmung der LAF-Aktivität dieses Testsystem. Zum Teil wurde auf die Bestimmung der LAF-Aktivität in unstimulierten Thymuszellen jedoch nicht verzichtet.

3.3.3. Die Wirkung verschiedener Dosen von dialysiertem und undialysiertem SUP von PZ-Kulturen auf mit PHA stimulierte und unstimulierte Thymuszellen
Überstände von PZ-Kulturen sollen neben einem nicht dialysierbaren LAF einen zweiten, dialysierbaren Faktor enthalten, der die Lymphozytenproliferation inhi-

biert und deshalb "Lymphocyte inhibiting Factor, LIF" genannt wurde (CALDERON et al. 1974, CALDERON & UNANUE 1975).

Um die Existenz eines solchen Faktors in unserem System zu prüfen, testeten wir deshalb den Effekt verschiedener Konzentrationen von dialysiertem und nicht-dialysiertem SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten und unstimulierten PZ-Kulturen auf die DNA-Synthese in mit PHA stimulierten und unstimulierten Thymuszellen.

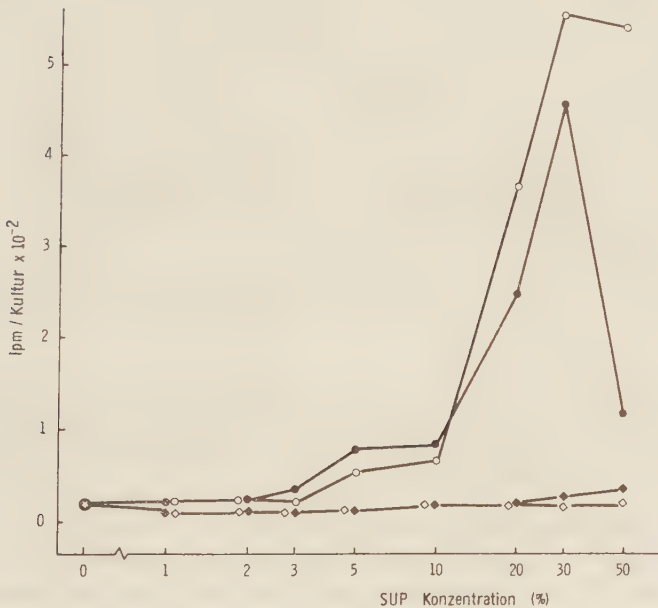


ABBILDUNG 18a: Dosis-Effekt-Kurve der LAF Wirkung auf Thymuszellen. PZ von BALB/c Mäusen wurden in 2 ml -Kulturen mit oder ohne 3',5'-cGMP (5 mM) für 48 h kultiviert. Jeweils 1 ml des SUP einer Kultur wurde anschließend dialysiert. Die LAF-Aktivität in den nicht dialysierten oder dialysierten SUP wurde durch Zugabe verschiedener Dosen (1% - 50%) dieser SUPs zu unstimulierten Thymuszellkulturen bestimmt. Der Thymidineinbau in den jeweiligen Thymuszellkulturen wurde nach einer Inkubationszeit von 48 h bestimmt. (●) nichtdialysierter SUP aus PZ-Kulturen mit 3',5'-cGMP; (○) dialysierter SUP aus PZ-Kulturen mit 3',5'-cGMP; (◆) nichtdialysierter SUP aus PZ-Kulturen ohne Testsubstanz; (◇) dialysierter SUP aus PZ-Kulturen ohne Testsubstanz. Jeder Punkt ist als Mittelwert aus jeweils drei Thymuszellkulturen angegeben, sam kleiner als 10%.

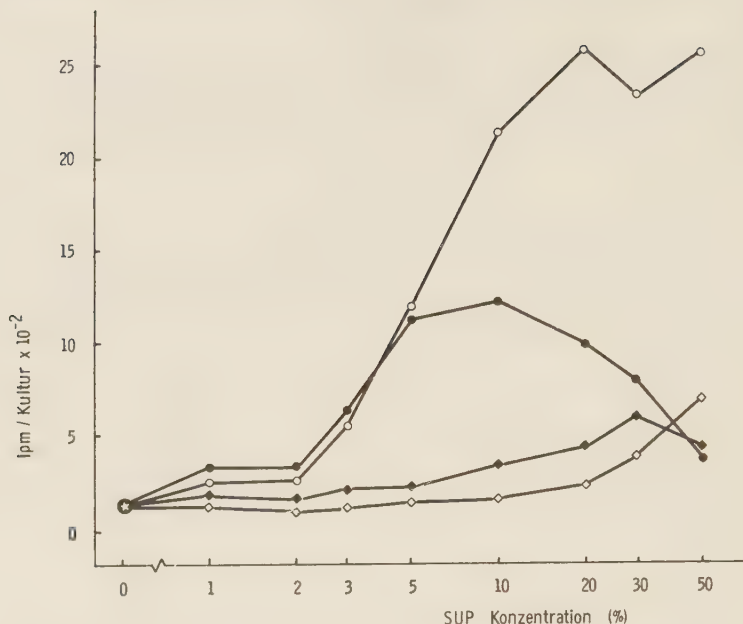


ABBILDUNG 18b: Dosis Effekt Kurve der LAF Wirkung auf mit PHA stimulierte Thymuszellkulturen. Die LAF Aktivität in den in Abb. 18a getesteten SUPs wurde in mit PHA (10_μg/ml) stimulierten Thymuszellkulturen bestimmt. Kulturbedingungen und Zeichen in der Abb. wie in Abb. 18 a.

In dem hier gezeigten Versuch (Abb. 18a, b) wird eine maximale Stimulierung des Thymidineinbaus in unstimulierten Thymuszellen durch undialysierten und dialysierten SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen bei einer SUP-Konzentration von 30% erreicht. Der dialysierte SUP zeigt eine höhere LAF-Aktivität als der nicht-dialysierte SUP. Während eine Erhöhung der Konzentration des dialysierten SUP auf 50% den Thymidineinbau in Thymuszellen nicht wesentlich ändert, fällt im Gegensatz dazu die DNA-Synthese bei einer Erhöhung der Konzentration des undialysierten SUP stark ab. SUP von PZ-Kulturen, die nicht in Gegenwart von 3',5'-cGMP kultiviert worden sind, zeigen bei keiner Konzentration eine Erhöhung des Thymidineinbaus in Thymuszellen. Der SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen zeigt mit durch PHA stimulierten Thymuszellen einen ähnlichen Verlauf wie mit unstimulierten Thymuszellen. Der undialy-

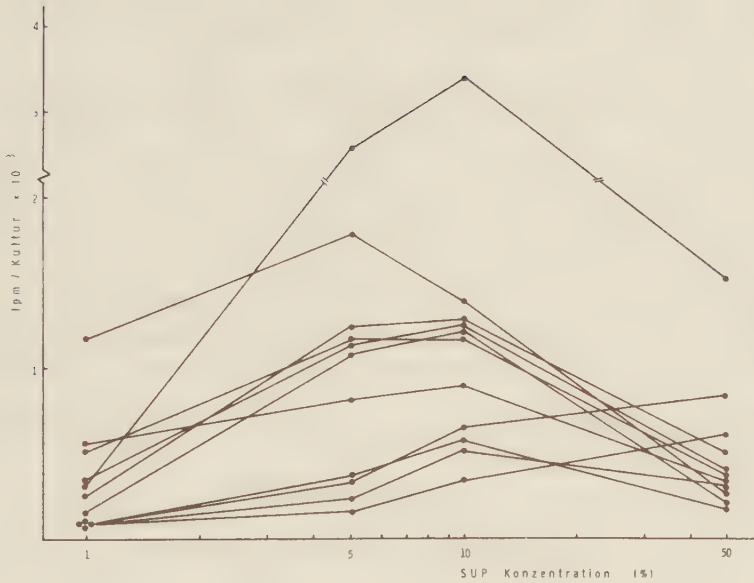


ABBILDUNG 19: Die Variationsbreite der Stimulierung der LAF-Produktion durch 3',5'-cGMP. BALB/c PZ wurden für 48 h in Gegenwart von 3',5'-cGMP (5 mM) kultiviert. Anschließend wurden PHA-stimulierte Thymuszellen von syngen Mäusen in Medium mit verschiedenen Dosen dieser SUPs inkubiert. Der Thymidineinbau wurde in 48 h Kulturen bestimmt. Jeder Punkt ist als Mittelwert aus drei Kulturen angegeben, sam kleiner als 10%. Alle Kurven sind in unabhängigen Versuchsansätzen ermittelt worden.

sierte SUP zeigt eine eingipfelige Kurve mit maximaler LAF-Aktivität bei einer Dosis von 10%. Der dialysierte SUP zeigt eine annähernd sigmoid verlaufende Kurve, bei der maximale Stimulierung bei einer Dosis von 20% erreicht wird.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei unstimulierten Thymuszellen gefunden werden, erhöht sowohl dialysierter als auch undialysierter SUP von unstimulierten PZ-Kulturen die DNA-Synthese in mit PHA stimulierten Thymuszellen. Allerdings ist die maximale LAF-Aktivität in diesen SUP wesentlich geringer als die LAF-Aktivität in SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen.

Die gemessenen LAF-Aktivitäten schwanken in verschiedenen Versuchen sehr stark. Abbildung 19 zeigt die große Variationsbreite des Effekts der Stimulierung der

LAF-Produktion. Wir testeten den undialysierten SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen in mit PHA stimulierten Thymuszellen in 12 unabhängigen Versuchen. Die Werte des maximalen Thymidineinbaus reichen von 203 Ipm/Kultur bis 3435 Ipm/Kultur. Daneben zeigt die Dosis-Effekt-Kurve auch Verschiebungen. Die maximale Dosis der Stimulierung durch den SUP schwankt zwischen 5% und 50%.

3.3.4. Die hemmende Wirkung von LIF auf die mitogene Stimulierung von Thymus- und Milzzellen

Aus den Ergebnissen in Abbildung 18a und b ließ sich schließen, daß neben einem nicht-dialysierbaren LAF ein dialysierbarer LIF in dem SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen existieren muß. Ein Ultrafiltrat eines solchen SUP dürfte demnach keine LAF-Aktivität, aber eine LIF-Aktivität zeigen. Wir prüften deshalb das Ultrafiltrat eines SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten und eines solchen von unstimulierten PZ-Kulturen in mit Con A und PHA stimulierten Thymuszellen. Die Ergebnisse in Tabelle 24 zeigen, daß das Ultrafiltrat des SUP

TABELLE 24: Die inhibierende Wirkung des Ultrafiltrats von SUP aus PZ-Kulturen auf die mitogene Stimulierung von Thymuszellen.

		primäre Zellkulturen			
		FZ	PZ+3',5'-cGMP	PZ	PZ+3',5'-cGMP
		LIF-Aktivität in Thymuszellkulturen mit			
		50% SUP	50% SUP	10% SUP	10% SUP
Mitogen	Exp.	% der mitogenen Antwort			
Con A	I	45 $\pm$ 3	43 $\pm$ 1	119 $\pm$ 8	89 $\pm$ 12
Con A	II	39 $\pm$ 3	41 $\pm$ 2	113 $\pm$ 9	107 $\pm$ 12
Con A	III	42 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	91 $\pm$ 3	77 $\pm$ 1
PHA	IV	33 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	89 $\pm$ 5	86 $\pm$ 6
PHA	V	63 $\pm$ 2	31 $\pm$ 4	100 $\pm$ 2	71 $\pm$ 4
PHA	VI	38 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1	65 $\pm$ 3	45 $\pm$ 1

BALB/c PZ wurden in Medium mit oder ohne 3',5'-cGMP (5 mM) kultiviert (Primär-Kultur). Nach 48 h wurde der SUP der Kulturen geerntet und ultrafiltriert. BALB/c Thymuszellen wurden mit Con A (5 µg/ml; Experiment I - III) oder PHA (10 µg/ml; Experiment IV - VI) in Kulturmedium mit 50% bzw. 10% der ultrafiltrierten SUPs stimuliert. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h bestimmt. Jeder Wert ist als das arithmetische Mittel ± sam aus drei Thymuszellkulturen angegeben. Alle Experimente wurden unabhängig voneinander durchgeführt.

von PZ-Kulturen inhibierende Eigenschaften sowohl auf mit PHA als auch auf mit Con A stimulierte Thymuszellen hat. Nur in drei der sechs Versuche ist die LIF-Aktivität in dem SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen größer als im SUP von unstimulierten PZ-Kulturen.

Die Wirkung von LIF ist dosisabhängig (Abb. 20).

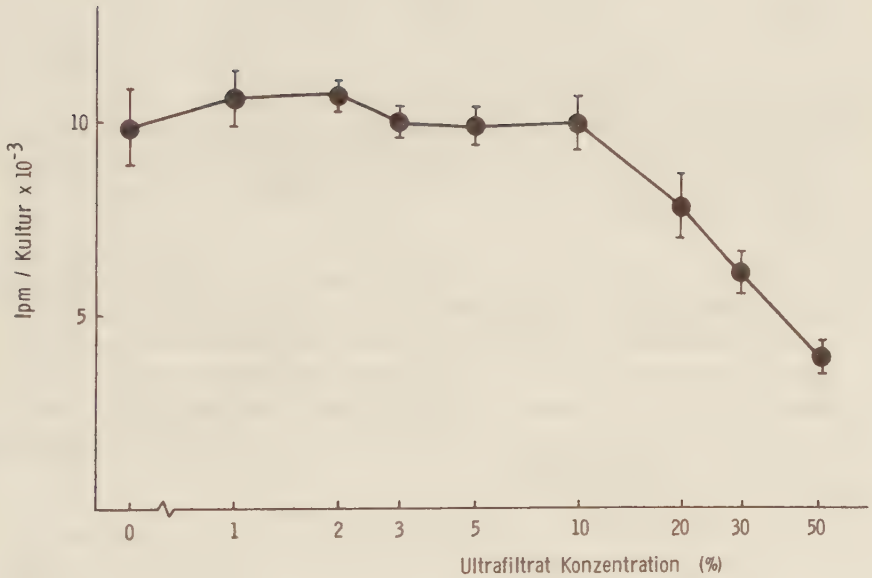


ABBILDUNG 20: Dosis Effekt Kurve der LIF-Wirkung auf die durch Con A stimulierte Antwort in Thymuszellen. BALB/c PZ wurden mit 3',5'-cGMP (5 mM) stimuliert. Nach einer Kulturzeit von 48 h wurde der SUP geerntet und ultrafiltriert. Verschiedene Dosen dieses Ultrafiltrats wurden mit Con A (5 µg/ml) stimulierten Thymuszellkulturen zugegeben und der Thymidineinbau in 48 h Kulturen bestimmt. Jeder Punkt ist als Mittelwert $\pm$ sam aus drei Thymuszellkulturen angegeben. Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz: 31 ± 2 Ipm/Kultur.

Neben der mitogenen Stimulierung von Thymuszellen inhibiert LIF auch die mitogene Stimulierung der Milzzellen durch ein T- oder ein B-Zell-Mitogen (PHA und LPS) (Tab. 25).

3.3.5. Die Kinetik der LAF-Sekretion

Peritonealzellen wurden in Medium mit oder ohne 3',5'-cGMP kultiviert. Nach verschieden langer Kulturdauer wurde der SUP geerntet, dialysiert und die LAF-Aktivität in mit PHA stimulierten Thymuszellkulturen bestimmt. 2 h nach Kulturbeginn ist im SUP der PZ-Kulturen noch keine LAF-Aktivität festzustellen (Abb. 21). Aber bereits nach 6 h ist eine LAF-Aktivität im SUP von mit

TABELLE 25: Die Wirkung von LIF auf die Stimulierung von Milzzellen durch LPS und PHA

Mitogen	LIF-Aktivität in Milzzellkulturen mit					
	ohne SUP		10% SUP		50% SUP	
			Ipm/Kultur			
PHA	17358	± 1771	13806	± 336	3262	± 212
LPS	2135	± 56	1629	± 66	356	± 18

BALB/c Milzzellen wurden in einem Kulturmedium mit 50% bzw. 10% des ultrafiltrierten SUPs von 3',5'-cGMP (5 mM) stimulierten PZ-Kulturen (Kulturzeit 48 h) mit PHA (10 µg/ml) oder LPS (50 µg/ml) stimuliert. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h in jeweils drei Mikrokulturen bestimmt. Jeder Wert gibt das Mittel - sam an.

3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen nachweisbar. Ein Anteil von 50% dieses SUP in Thymuszellkulturen erhöht die DNA-Synthese nach Stimulierung mit PHA mehr als halbmaximal. Die mit 10% SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen gemessene LAF-Aktivität steigt wesentlich langsamer an. So ist eine Kulturzeit der PZ von nahezu 48 h notwendig, um halbmaximale LAF-Aktivität zu erhalten. Nach 72 h Kulturzeit ist die mit 50% SUP und mit 10% SUP gemessene LAF-Aktivität fast gleich hoch.

3.3.6. Der Einfluß von LAF und LIF auf die Proliferation von Lymphozyten

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die durch LAF und LIF beeinflusste DNA-Synthese in Lymphozyten mit der Proliferationsrate dieser Zellen einhergeht. Wir kultivierten deshalb mit PHA stimulierte Thymuszellen in Gegenwart von LAF, bzw. mit Con A stimulierte Thymuszellen in Gegenwart von LIF, und bestimmten sowohl den Thymidineinbau als auch die Anzahl der Colcemid-Metaphasen in diesen Kulturen.

Die Tabelle 26 zeigt, daß LAF in mit PHA stimulierten Thymuszellkulturen die Zahl der Colcemid-Metaphasen und damit die Proliferationsrate der Zellen erhöht und LIF die Zahl der Colcemid-Metaphasen in mit Con A stimulierten Thymuszellkulturen erniedrigt und damit die Proliferation dieser Zellen hemmt.

3.3.7. Die zelluläre Herkunft von LAF

Neben Makrophagen findet man in einer PZ-Population auch 10 - 20% Lymphozyten (Tab. 4). Es war deshalb nötig, die zelluläre Herkunft des durch 3',5'-cGMP erzeugten LAF näher zu bestimmen. Wir entfernten deshalb aus der PZ-Population die phagozytierenden Zellen, kultivierten diese PL und die ursprünglichen PZ mit und ohne 3',5'-cGMP und bestimmten in den SUP dieser Kulturen die LAF-Aktivität.

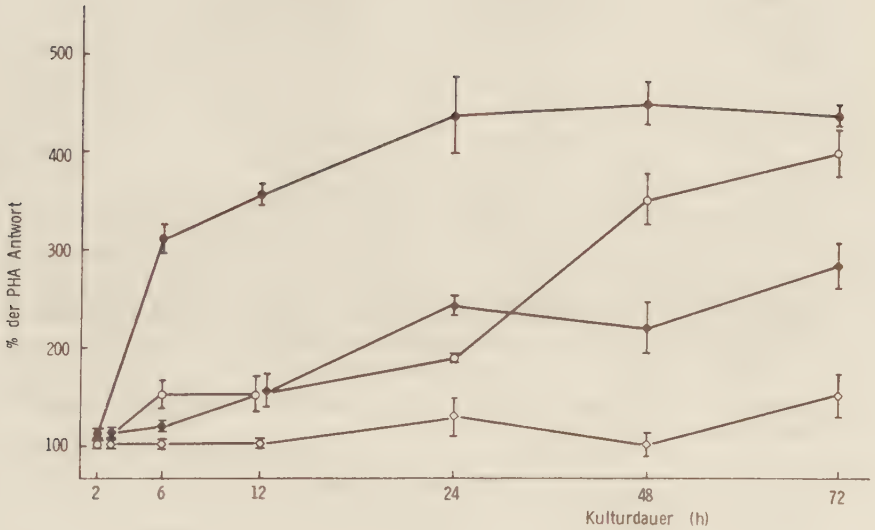


ABBILDUNG 21: Die Kinetik der LAF Produktion. PZ von BALB/c Mäusen wurden in Kulturmedium mit oder ohne 3',5'-cGMP (5 mM) kultiviert. Nach verschiedenen Kulturzeiten wurden die SUPs abgeerntet und dialysiert. Die LAF-Aktivität wurde durch Ermittlung des Thymidineinbaus in mit PHA (10 µg/ml) stimulierten Thymuszellen bestimmt. (●) Thymuszellkulturen in Medium mit 50% dialysierten SUP aus mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen; (◆) Thymuszellkulturen in Medium mit 50% dialysierten SUP aus unstimulierten PZ-Kulturen; (○) Thymuszellkulturen in Medium mit 10% dialysierten SUP aus mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen; (◇) Thymuszellkulturen in Medium mit 10% dialysierten SUP aus unstimulierten PZ-Kulturen. Jeder Punkt ist als das Mittel $\pm$ sam aus drei Thymuszellkulturen angegeben. PHA-stimulierte Thymuszellkulturen: 572 ± 23 Ipm/Kultur; Kontroll-Kulturen ohne Testsubstanz: 16 ± 1 Ipm/Kultur.

Die Tabelle 27a zeigt einen typischen Versuch, der mit diesen PL durchgeführt wurde. Im Gegensatz zu der Wirkung in PZ-Kulturen hat 3',5'-cGMP keinen stimulierenden Einfluß auf die LAF-Produktion in PL-Kulturen, da 3',5'-cGMP die Abgabe von LAF in das Kulturmedium dieser Zellen nicht erhöht, sondern sogar reduziert. In vier weiteren Versuchen konnte ebenfalls eine solche Hemmung beobachtet werden, in einem Versuch war weder ein hemmender noch ein stimulierender Effekt von 3',5'-cGMP auf die Freisetzung von LAF aus PL festzustellen. In allen fünf Versuchen war jedoch die PR des SUP von mit 3',5'-cGMP

TABELLE 26: Die Wirkung von LAF und LIF auf die Proliferation von Thymuszellen.

Mitogen	Zell Mitosis % Metaphasen	Thymidin- einbau Ipm/Kultur
PHA	0.4	142 $\pm$ 11
PHA + LAF	3.9	2574 $\pm$ 134
Con A	10.4	6452 $\pm$ 191
Con A + LIF	0.3	201 $\pm$ 22
nihil	0.1	20 $\pm$ 3

BALB/c Thymuszellen wurden entweder in Kulturmedium mit PHA (10 µg/ml) oder mit PHA und LAF (50% dialysierter SUP aus mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen bei einer Kulturzeit von 48 h) oder in Kulturmedium mit Con A (5 µg/ml) bzw. Con A und LIF (50% ultrafiltrierter SUP durch 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen bei einer Kulturdauer von 48 h) inkubiert. In Parallel-Kulturen wurde nach 48 h der Thymidineinbau in jeweils drei Mikrokulturen und nach 72 h in 2-ml-Kulturen die Anzahl der Colcemid-Metaphasen bestimmt.

TABELLE 27a: Die Wirkung von 3',5'-cGMP auf den LAF-Release aus Peritoneal-Lymphozyten.

Primär- Kultur	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen mit					
	5% SUP		10% SUP		50% SUP	
	Ipm/Kultur	PR	Ipm/Kultur	PR	Ipm/Kultur	PR
PZ	202 $\pm$ 7	1.0	184 $\pm$ 11	1.0	895 $\pm$ 61	1.0
PZ + 3',5'-cGMP	668 $\pm$ 31	3.3	1081 $\pm$ 57	5.9	884 $\pm$ 47	1.0
PL	199 $\pm$ 12	1.0	234 $\pm$ 10	1.0	343 $\pm$ 10	1.0
PL + 3',5'-cGMP	149 $\pm$ 3	0.7	154 $\pm$ 2	0.7	215 $\pm$ 10	0.6

Aus PZ von BALB/c Mäusen wurden durch Inkubation mit LSR die phagozytierenden Zellen entfernt. Diese gereinigte Zellpopulation (PL) oder die ursprüngliche PZ-Population wurden für 48 h in Medium mit oder ohne 3',5'-cGMP (5 mM) kultiviert. Zur Bestimmung der LAF-Aktivität in den dialysierten SUPs wurde der Thymidineinbau in PHA-stimulierten Thymuszellen gemessen. Jeder Wert gibt das Mittel $\pm$ sam aus drei Kulturen an. PHA-stimulierte Thymuszellen: 128 $\pm$ 3 Ipm/Kultur; Kontrollkulturen ohne Testsubstanz: 14 $\pm$ 1 Ipm/Kultur.

stimulierten PZ-Kulturen größer als die PR des SUP von mit 3',5'-cGMP kultivierten PL (Tab. 27b). In SUP von Thymus- und Milzzellkulturen läßt sich ebenfalls ein LAF nachweisen (Tab. 28). Ebenso wie in PL-Kulturen hemmt jedoch 3',5'-cGMP die Freisetzung von LAF.

TABELLE 27b: Die Freisetzung von LAF aus Peritoneal-Lymphozyten

	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen mit	
	10% SUP	50% SUP
	$\frac{PR_{pz}}{PR_{pl}}$	
Exp. I	2.8 ± 0.6	-
Exp. II	1.8 ± 0.2	9.2 ± 2.1
Exp. III	8.9 ± 0.8	1.6 ± 0.2
Exp. IV	30.2 ± 5.1	3.5 ± 0.6
Exp. V	1.3 ± 0.2	6.4 ± 1.2

Die PZ- und PL-Kulturen und die Bestimmung der LAF-Aktivität in PHA-stimulierten Thymuszellen wurden wie in Tab. 27a angegeben durchgeführt. Die Ergebnisse sind als das Verhältnis der PR in Thymuszellkulturen mit SUPs aus PZ-Kulturen (PR_{pz}) zu der PR in Thymuszellkulturen mit SUPs aus PL-Kulturen (PR_{pl}) angegeben. Jedes Experiment ist unabhängig von den anderen durchgeführt worden.

TABELLE 28: Der LAF in SUP aus Thymus- und Milzzellkulturen

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen mit			
	10% SUP	PR	50% SUP	PR
Thymuszellen	162 ± 37	1.0	510 ± 15	1.0
Thymuszellen + 3',5'-cGMP	98 ± 7	0.6	209 ± 12	0.4
Milzzellen	164 ± 4	1.0	863 ± 43	1.0
Milzzellen + 3',5'-cGMP	88 ± 5	0.5	211 ± 6	0.2

BALB/c Thymus- oder Milzzellen wurden in Medium mit oder ohne 3',5'-cGMP (5 mM) inkubiert (Primär-Kultur). Nach einer Kulturdauer von 48 h wurde der SUP abgehoben und dialysiert. Die LAF-Aktivität wurde in mit PHA stimulierten Thymuszellkulturen bestimmt. Jeder Wert gibt das Mittel $\pm$ sam aus drei Thymuszellkulturen an.

3.3.8. Die Wirkung verschiedener Hemmer von Zellfunktionen auf die 3',5'-cGMP-abhängige LAF-Produktion

EGTA und 3',5'-cAMP inhibieren beide u.a. die mitogene und antigene Stimulierung von Lymphozyten. Die LAF-Produktion der PZ dagegen ist nicht von exogenem Ca^{++} abhängig. Auch 3',5'-cAMP kann diese Wirkung von 3',5'-cGMP nicht hemmen (Tab. 29).

TABELLE 29: Die von Ca^{++} und 3',5'-cAMP unabhängige LAF-Produktion

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen			
	Exp. I	Exp. II Ipm/Kultur	Exp. III	Exp. IV
PZ+3',5'-cGMP (5 mM)	587 $\pm$ 31	735 $\pm$ 44	223 $\pm$ 10	414 $\pm$ 14
PZ+3',5'-cGMP (5 mM) + EGTA (0.6 mM)	940 $\pm$ 57	1037 $\pm$ 95	294 $\pm$ 17	304 $\pm$ 32
PZ+3',5'-cGMP (5 mM) +3',5'-cAMP (1 mM)	-	814 $\pm$ 26	-	373 $\pm$ 18
PZ	238 $\pm$ 15	171 $\pm$ 11	86 $\pm$ 19	155 $\pm$ 8
ohne SUP + PHA	69 $\pm$ 6	168 $\pm$ 5	48 $\pm$ 2	117 $\pm$ 6
nihil	17 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1

PZ von BALB/c Mäusen wurden in Medium mit den in den Tabellen angegebenen Substanzen für 48 h kultiviert (Primär-Kultur). Zur Bestimmung der LAF Aktivität wurde der Thymidineinbau in jeweils drei mit PHA (10 $\mu\text{g/ml}$) stimulierten Thymuszellkulturen mit 10% dialysierten SUP von PZ-Kulturen gemessen. Jeder Wert gibt das arithmetische Mittel $\pm$ sam aus drei Kulturen an. Die vier angegebenen Versuche wurden unabhängig voneinander durchgeführt.

TABELLE 30: Die Wirkung von Cycloheximid und Actinomycin D auf die LAF-Produktion

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen			
	Exp. I	Exp. II Ipm/Kultur	Exp. III	Exp. IV
PZ + Cycloheximid	176 $\pm$ 6	195 $\pm$ 2	-	86 $\pm$ 2
PZ + Cycloheximid + 3',5'-cGMP	183 $\pm$ 5	284 $\pm$ 7	-	76 $\pm$ 8
PZ + Actinomycin D	18 $\pm$ 1	174 $\pm$ 6	52 $\pm$ 7	-
PZ + Actinomycin D + 3',5'-cGMP	15 $\pm$ 2	134 $\pm$ 15	48 $\pm$ 15	-
PZ + 3',5'-cGMP	414 $\pm$ 14	783 $\pm$ 45	141 $\pm$ 19	294 $\pm$ 14
PZ	155 $\pm$ 8	226 $\pm$ 38	47 $\pm$ 2	86 $\pm$ 19
ohne SUP + PHA	117 $\pm$ 6	128 $\pm$ 3	59 $\pm$ 3	48 $\pm$ 2
nihil	13 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2

BALB/c PZ wurden für 48 h in Medium mit den in der Tabelle angegebenen Substanzen kultiviert (Primär-Kultur). 3',5'-cGMP: 5 mM; Cycloheximid: 200 $\mu\text{g/ml}$; Actinomycin D: 5 $\mu\text{g/ml}$. Zur Bestimmung der LAF-Aktivität wurde der Thymidineinbau in jeweils drei mit PHA (10 $\mu\text{g/ml}$)-stimulierten Thymuszellkulturen mit 10% des dialysierten SUP der jeweiligen PZ-Kulturen gemessen.

Cycloheximid, ein Hemmer der Proteinbiosynthese, blockiert zwar die von 3',5'-cGMP abhängige LAF-Produktion, nicht jedoch das Entstehen von LAF in unstimulierten PZ-Kulturen (Tab. 30).

Die 3',5'-cGMP-abhängige LAF-Produktion wird ebenfalls durch Actinomycin D, einem Hemmer der mRNA-Synthese, verhindert. In zwei der drei durchgeführten Versuche inhibiert Actinomycin D auch die LAF-Produktion in unstimulierten PZ-Kulturen (Tab. 30).

Colchicin und Cytochalasin B haben dissoziierende Eigenschaften auf intrazelluläre kontraktile Strukturen wie Mikrotubuli und Mikrofilamente. Sie erhöhen beide die LAF-Produktion in PZ-Kulturen. Beide Substanzen verändern aber die von 3',5'-cGMP stimulierte LAF-Produktion nicht (Tab. 31).

TABELLE 31: Die Wirkung von Colchicin und Cytochalasin B auf die LAF-Produktion

		LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen mit	
		50% SUP	10% SUP
Primär-Kultur		Ipm/Kultur	
PZ + Colchicin	(1 μ M)	390 $\pm$ 15	188 $\pm$ 6
PZ + Colchicin	(1 μ M)	390 $\pm$ 27	375 $\pm$ 16
+ 3',5'-cGMP	(5 mM)		
PZ + Cytochalasin B	(5 μ g/ml)	335 $\pm$ 1	257 $\pm$ 3
PZ + Cytochalasin B	(5 μ g/ml)	341 $\pm$ 18	358 $\pm$ 22
+ 3',5'-cGMP	(5 mM)		
PZ + 3',5'-cGMP	(5 mM)	381 $\pm$ 11	414 $\pm$ 14
PZ		288 $\pm$ 20	155 $\pm$ 8

PZ von BALB/c Mäusen wurden für 48 h in Medium mit den angegebenen Substanzen kultiviert (Primär-Kultur). Die LAF-Aktivität wurde in mit PHA (10 μ g/ml) stimulierten Thymuszellkulturen mit 50% bzw. 10% des dialysierten SUP der jeweiligen PZ-Kulturen bestimmt. Der Thymidineinbau wurde in jeweils drei Kulturen bestimmt. Jeder Wert gibt das arithmetische Mittel $\pm$ sam an.

3.3.9. Das Fehlen aktivierender Eigenschaften des SUP von lysierten PZ

Da wir prüfen wollten, ob LAF in den PZ de novo synthetisiert wird oder ob er schon in den PZ bei Kulturbeginn vorliegt und nur mehr oder weniger schnell an das Medium abgegeben wird, lysierten wir PZ, ohne sie kultiviert zu haben, und bestimmten die LAF-Aktivität in dem SUP. Wie Tabelle 32 zeigt, übt der SUP dieser lysierten PZ nur geringe bzw. gar keine LAF-Aktivität auf mit PHA stimulierte Thymuszellen aus.

TABELLE 32: Das Fehlen von LAF im SUP von lysierten PZ-Kulturen

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen	
	Exp. I	Exp. II
	Ipm/Kultur	
PZ + 3',5'-cGMP (5 mM)	414 $\pm$ 14	372 $\pm$ 3
lysierte PZ	141 $\pm$ 3	58 $\pm$ 5
PZ	155 $\pm$ 8	171 $\pm$ 14
ohne SUP + PHA	117 $\pm$ 6	45 $\pm$ 2
nihil	13 $\pm$ 6	11 $\pm$ 1

PZ von BALB/c Mäusen wurden entweder im Medium mit oder ohne 3',5'-cGMP für 48 h kultiviert oder bei Kulturbeginn durch Ultraschall lysiert (Primär-Kultur). Die LAF-Aktivität in den dialysierten Überständen wurde bestimmt wie in Tab. 30 beschrieben. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

TABELLE 33: Die inhibierende Wirkung von EGTA und 3',5'-cAMP auf die Stimulierung von Milzzellen durch LAF

Testsubstanzen	Thymidineinbau	
	Ipm/Kultur	StR
LAF	354 $\pm$ 18	3.9
LAF + EGTA	15 $\pm$ 1	0.2
LAF + 3',5'-cAMP	59 $\pm$ 7	0.6
nihil	91 $\pm$ 5	1.0

BALB/c Milzzellen wurden mit LAF (siehe Tab. 26) stimuliert. EGTA (0.6 mM) oder 3',5'-cAMP (1 mM) wurde zu Beginn der Kulturen dem Medium zugesetzt. Nach 48 h Kulturdauer wurde der Thymidineinbau bestimmt. Jeder Wert ist als das Mittel $\pm$ sam aus drei Mikro-Kulturen angegeben.

3.3.10. Die Hemmung der Wirkung von LAF durch EGTA und 3',5'-cAMP

Wie die mitogene Stimulierung ist auch die LAF-Wirkung von Ca^{++} abhängig und läßt sich durch 3',5'-cAMP inhibieren (Tab. 33).

3.3.11. Die Stimulierung der DNA-Synthese von Milz- und Thymuszellen der Maus durch A 23187

BALB/c Milz- oder Thymuszellen wurden in Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen von A 23187 inkubiert, der Thymidineinbau wurde nach 48 h bestimmt. A 23187 erhöht in einem Konzentrationsbereich von 5×10^{-7} bis 1×10^{-6} M die DNA-Synthese in Milz- und Thymuszellkulturen (Abb. 22). Die Erhöhung der DNA-Synthese durch A 23187 ist in Thymuszellen jedoch wesentlich geringer als in Milzzellen.

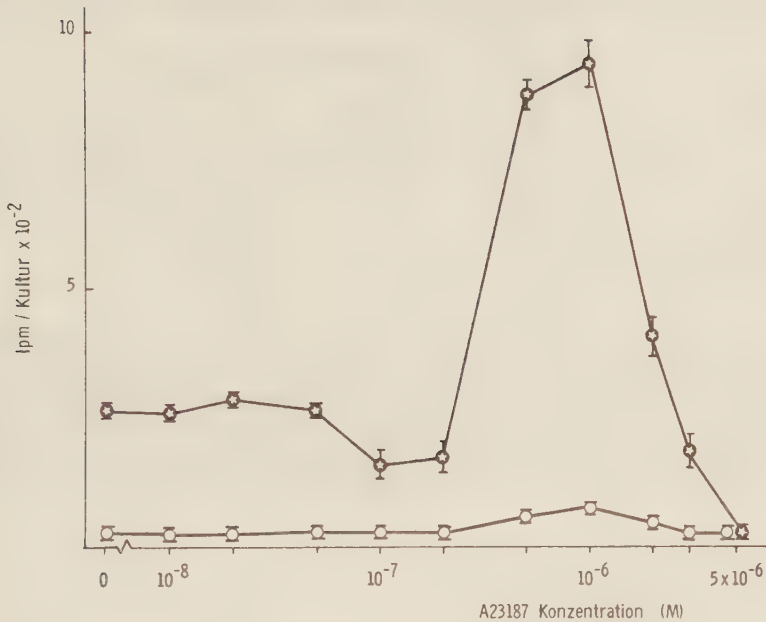


ABBILDUNG 22: Dosis-Effekt-Kurve des Ionophores A 23187 auf die DNA-Synthese in Thymus und Milzzellen. BALB/c Thymus- oder Milzzellen wurden in Medium mit verschiedenen Konzentrationen von A 23187 kultiviert. Nach 48 h in Mikrokultur wurde der Thymidineinbau bestimmt. (●) Milzzellkulturen mit A 23187; (○) Thymuszellkulturen mit A 23187. Jeder Punkt gibt den Mittelwert $\pm$ sam aus drei Kulturen an. Milzzellkulturen mit DMSO (1 μ l/ml): 264 ± 15 Ipm/Kultur; Thymuszellkulturen mit DMSO (1 μ l/ml): 21 ± 1 Ipm/Kultur.

Die Stimulierung der Milzzellen durch A 23187 scheint ähnlich wie die durch 3',5'-cGMP makrophagenabhängig zu sein. Werden aus einer Milzzellpopulation die phagozytierenden Zellen (größtenteils Makrophagen) entfernt, so ist die DNA-Synthese in mit 3',5'-cGMP und in mit A 23187 stimulierten Kulturen erheblich geringer als bei Verwendung der ursprünglichen Milzzellpopulation (Tab. 34). Nach Zugabe von 10% PZ zu der nicht-phagozytierenden Milzzellpopulation erhöht sich die Antwort auf A 23187 auf den ursprünglichen Wert, und die Antwort auf 3',5'-cGMP sogar noch über den Wert der nicht gereinigten Milzzellpopulation hinaus.

TABELLE 34: Die Stimulierung der DNA-Synthese durch A 23187 in einer nicht-phagozytierenden Milzzellpopulation

Mitogen		Milz	nph Milz	nph Milz + 10% PZ
		Ipm/Kultur		
PHA	(10 µg/ml)	2234 ± 34	3041 ± 248	4129 ± 236
LPS	(50 µg/ml)	1886 ± 16	1304 ± 32	498 ± 27
A23187	(1 µM)	514 ± 37	217 ± 35	505 ± 33
3',5'-cGMP	(5 mM)	552 ± 9	226 ± 13	1121 ± 138
nihil		91 ± 5	57 ± 4	103 ± 6

Aus BALB/c Milzzellen wurden durch Behandlung mit LSR die phagozytierenden Zellen abgetrennt. Diese gereinigte Zell-Population (nph Milz) wurde in Medium mit den in der Tabelle angegebenen Substanzen in Mikro-Kulturen kultiviert. Parallel dazu wurden die selben Testsubstanzen in Kulturen mit der ursprünglichen Milzzellpopulation oder in Kulturen einer Milzzellpopulation aus nicht phagozytierenden Zellen mit einem Zusatz von 10% PZ getestet. Nach einer Kulturdauer von 48 h wurde der Thymidineinbau bestimmt. Die angegebenen Ergebnisse sind jeweils als der Mittelwert ± sam aus drei Kulturen angegeben.

3.3.12. Die erhöhte LAF-Produktion nach Stimulation von PZ mit A 23187

Wir haben oben gezeigt, daß die Stimulierung der DNA-Synthese von Lymphozyten ähnlich wie durch Zugabe von 3',5'-cGMP auch bei Anwesenheit von A 23187 von Makrophagen abhängig ist. Daraus ergab sich die Frage, ob diese makrophagenabhängige Stimulierung durch A 23187 ebenfalls durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Wir kultivierten deshalb PZ in Gegenwart von A 23187 und testeten den dialysierten SUP in mit PHA stimulierten Thymuszellen auf seine LAF-Aktivität.

Der SUP von mit A 23187 stimulierten PZ-Kulturen hat wie der SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten Kulturen Lymphozyten aktivierende Eigenschaften (Tab. 35). In allen getesteten SUPs von PZ-Kulturen war die LAF-Aktivität nach einer Stimulierung mit A 23187 größer als nach Stimulierung mit 3',5'-cGMP. Die maximale Aktivierung von mit PHA stimulierten Thymuszellen durch die beiden SUPs scheint jedoch gleich zu sein. SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen in einer Dosis von 50% in mit PHA stimulierten Thymuszellen ergibt die gleiche LAF-Aktivität wie die selbe Dosis des SUP von mit A 23187 PZ-Kulturen (Abb. 23). Eine maximale Aktivierung der mit PHA stimulierten Thymuszellen wird durch SUP von mit A 23187 stimulierten PZ-Kulturen jedoch schon bei einer Konzentration von 5% erreicht, einer Konzentration, bei der der SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen nur wenig LAF-Aktivität zeigt.

TABELLE 35: Die Stimulierung der LAF-Produktion durch A 23187

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen			
	Exp.I	Exp.II Ipm/Kultur	Exp.III	Exp.IV
PZ + A 23187 (1 μ M)	455 $\pm$ 40	3798 $\pm$ 132	1276 $\pm$ 25	372 $\pm$ 3
PZ+3',5'-cGMP (5mM)	414 $\pm$ 14	1880 $\pm$ 201	223 $\pm$ 10	-
PZ + DMSO (1 μ l/ml)	152 $\pm$ 8	-	-	82 $\pm$ 15
PZ	155 $\pm$ 8	539 $\pm$ 5	86 $\pm$ 19	171 $\pm$ 14
ohne SUP + PHA	117 $\pm$ 6	108 $\pm$ 8	48 $\pm$ 2	45 $\pm$ 2
nihil	13 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1

PZ von BALB/c Mäusen wurden für 48 h in Medium mit den angegebenen Substanzen kultiviert (Primär-Kultur). Zur Bestimmung der LAF-Aktivität wurden mit PHA (10 μ /ml) stimulierte Thymuszellen in Medium mit 10% des dialysierten SUPs der jeweiligen PZ-Kulturen kultiviert. Nach 48 h Kulturdauer wurde der Thymidineinbau in jeweils drei Kulturen bestimmt. Jedes Ergebnis ist als das arithmetische Mittel $\pm$ sam angegeben. Die Tabelle gibt die Ergebnisse aus vier voneinander unabhängigen Versuchen wieder.

3.3.13. Die Wirkung von Inhibitoren der Protein-bzw. mRNA-Synthese und von 3',5'-cAMP auf die Stimulierung der LAF-Produktion durch A 23187 in PZ-Kulturen

Da wir den Mechanismus der mit 3',5'-cGMP induzierten LAF-Produktion und den der durch A 23187 stimulierten LAF-Produktion vergleichen wollten, haben wir PZ in Kulturen mit Cycloheximid, Actinomycin D oder 3',5'-cAMP mit A 23187 stimuliert. Cycloheximid und Actinomycin D hemmen die von A 23187 stimulierte LAF-Produktion (Tab. 36). Das Auftreten von LAF in dem SUP dieser Kulturen ist also ebenso wie in mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen sowohl von der Proteinsynthese als auch von der mRNA-Synthese abhängig. 3',5'-cAMP hat auch in von A 23187 stimulierten PZ keine Wirkung auf die LAF-Produktion.

3.3.14. Die Ca⁺⁺-unabhängige Wirkung des Ca-Ionophores A 23187 auf die LAF-Produktion

Die Stimulierung der LAF-Produktion durch 3',5'-cGMP ist von exogenem Ca⁺⁺ unabhängig. Daraus ergibt sich die Frage, ob A 23187 ebenfalls unabhängig von Ca⁺⁺ die LAF-Produktion stimuliert. Dies ist tatsächlich der Fall. A 23187 stimuliert die LAF-Produktion in PZ-Kulturen auch bei einer Zugabe von EGTA in einer für eine mitogene Stimulierung hemmenden Konzentration zu Kulturmedium (Tab. 37). Die Wirkung von A 23187 auf die LAF-Produktion ist von freien Ca-Ionen unabhängig.



ABBILDUNG 23: Dosis-Effekt-Kurve von SUP aus A 23187 stimulierten PZ-Kulturen auf die PHA-Antwort von Thymuszellen. BALB/c PZ wurden in Medium mit A 23187 (1, μ M) oder mit 3',5'-cGMP (5 mM) für 48 h kultiviert. Zur Bestimmung der LAF-Aktivität wurden BALB/c Thymuszellen in Medium mit PHA (10 μ g/ml) und verschiedenen Dosen dialysierter SUPs der jeweiligen PZ-Kulturen inkubiert. Der Thymidineinbau wurde nach 48 h Kulturdauer bestimmt. (●) Thymuszellkulturen in Medium mit SUP von durch A 23187 stimulierten PZ-Kulturen; (○) Thymuszellkulturen in Medium mit SUP von durch 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen; (◆) Thymuszellkulturen in Medium mit SUP von unstimulierten PZ-Kulturen. Jeder Punkt ist als Mittelwert $\pm$ sam aus jeweils drei Kulturen angegeben. Thymuszellkulturen mit PHA: 48 ± 2 Ipm/Kultur; Thymuszellkulturen ohne Testsubstanz: 14 ± 2 Ipm/Kultur.

3.3.15. Die unterschiedliche Wirkung von 3',5'-cGMP, A 23187 und LAF auf die Lymphozytenstimulation

Es wurde gezeigt, daß die Wirkung von 3',5'-cGMP auf die Lymphozytenstimulation zumindest teilweise durch die LAF-Produktion in Makrophagen vermittelt ist. Zum Anderen verringern PZ die Fähigkeit von 3',5'-cGMP, die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP auf die mitogene Stimulierung aufzuheben (Tab. 17). Um die Vermutung zu bestätigen, daß die antagonistische Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP nicht durch lösliche Faktoren von Makrophagen verursacht sein kann, testeten wir die Fähigkeit von A 23187 und von LAF, die Inhibition der

TABELLE 36: Die Wirkung von Cycloheximid, Actinomycin D und 3',5'-cAMP auf die von A 23187 stimulierte LAF-Produktion

LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen mit			
		50% SUP	10% SUP
Primär-Kultur		Ipm/Kultur	
PZ + A 23187	(1 μ M)	571 $\pm$ 14	455 $\pm$ 40
PZ + A 23187	(1 μ M)	223 $\pm$ 11	173 $\pm$ 10
+ Cycloheximid	(200 μ g/ml)		
PZ + A 23187	(1 μ M)	140 $\pm$ 4	138 $\pm$ 6
+ Actinomycin D	(5 μ g/ml)		
PZ + A 23187	(1 μ M)	439 $\pm$ 13	345 $\pm$ 30
+ 3',5'-cAMP	(1 mM)		
PZ + DMSO	(1 μ l/ml)	237 $\pm$ 12	152 $\pm$ 8
PZ		288 $\pm$ 20	155 $\pm$ 8

PZ von BALB/c Mäusen wurden in Medium mit den in der Tabelle angegebenen Substanzen für 48 h kultiviert (Primär-Kultur). Zur Bestimmung der LAF-Aktivität wurde der Thymidineinbau in durch PHA (10 μ g/ml) stimulierte Thymuszellkulturen mit 10% dialysiertem SUP der jeweiligen PZ-Kultur bestimmt. Jeder Wert ist als das arithmetische Mittel $\pm$ sam aus drei Thymuszellkulturen angegeben. Thymuszellkulturen mit PHA: 117 $\pm$ 6 Ipm/Kultur; Thymuszellkulturen ohne Testsubstanz: 13 $\pm$ 1 Ipm/Kultur.

TABELLE 37: Die von Ca⁺⁺ unabhängige Stimulierung der LAF-Produktion durch A 23187

Primär-Kultur	LAF-Aktivität in mit PHA-stimulierten Thymuszellkulturen		
	Exp. I	Exp. II	Exp. III
Ipm/Kultur			
PZ + A 23187	1276 $\pm$ 25	455 $\pm$ 40	372 $\pm$ 3
PZ + A 23187 + EGTA	1229 $\pm$ 103	382 $\pm$ 24	352 $\pm$ 17
PZ + DMSO	-	152 $\pm$ 8	82 $\pm$ 15
PZ	86 $\pm$ 19	155 $\pm$ 8	171 $\pm$ 14
ohne SUP + PHA	48 $\pm$ 2	117 $\pm$ 6	45 $\pm$ 2
nihil	14 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1

BALB/c PZ wurden in Medium mit A 23187 (1 μ M), A 23187 (1 μ M) und EGTA (0.6 mM) oder als Kontrolle mit DMSO (1 μ l/ml) für 48 h kultiviert (Primär-Kultur). Zur Bestimmung der LAF-Aktivität wurde der Thymidineinbau in durch PHA (10 μ g/ml) stimulierten Thymuszellkulturen mit 10% dialysiertem SUP der jeweiligen PZ Kultur bestimmt. Jeder Wert gibt das Mittel $\pm$ sam aus drei Thymuszellkulturen an. Die Tabelle gibt die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen wieder.

TABELLE 38: Das Fehlen einer Wirkung von A 23187 und LAF auf die Inhibierung der mitogenen Stimulierung durch 3',5'-cAMP

		Thymidineinbau	
Testsubstanz		Ipm/Kultur	StR
LPS	(50 µg/ml)	1886 ± 16	20.7
LPS + 3',5'-cAMP	(1 mM)	240 ± 2	2.6
LPS + 3',5'-cAMP + 3',5'-cGMP	(1 mM) (5 mM)	1258 ± 39	13.8
LPS + 3',5'-cAMP + A 23187	(1 mM) (1 µM)	166 ± 6	1.8
LPS + 3',5'-cAMP + LAF	(1 mM) (50% SUP)	296 ± 8	3.3
PHA	(10 µg/ml)	2234 ± 34	24.5
PHA + 3',5'-cAMP	(1 mM)	33 ± 3	0.4
PHA + 3',5'-cAMP + 3',5'-cGMP	(1 mM) (5 mM)	784 ± 31	8.6
PHA + 3',5'-cAMP + A 23187	(1 mM) (1 µM)	43 ± 3	0.5
PHA + 3',5'-cAMP + LAF	(1 mM) (50% SUP)	54 ± 2	0.6
3',5'-cGMP	(1 mM)	552 ± 9	6.1
A 23187	(1 µM)	514 ± 37	5.6
LAF	(50% SUP)	354 ± 18	3.9
nihil		91 ± 5	1.0

BALB/c Milzzellen wurden in Mikrokultur in Medium mit den angegebenen Substanzen inkubiert (LAF: 50% dialysierter SUP von 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen). Der Thymidineinbau wurde nach einer Kulturdauer von 48 h bestimmt. Jeder Wert ist als das Mittel $\pm$ sam aus drei Kulturen angegeben.

mitogenen Stimulierung durch 3',5'-cAMP wieder aufzuheben.

Obwohl A 23187 und auch LAF die DNA-Synthese der Milzzellen stimulieren, können beide im Gegensatz zu 3',5'-cGMP weder die Antwort auf PHA noch die Antwort auf LPS unter dem inhibierenden Einfluß von 3',5'-cAMP wieder erhöhen (Tab. 38).

4. DISKUSSION

4.1. Die Rolle von Ca^{++} bei der Aktivierung von Lymphozyten

Mit allen geprüften T- und B-Zell-Mitogenen (PHA, Con A, DS, LPS) fanden wir eine absolute Notwendigkeit von exogenem Ca^{++} zur Aktivierung von Lymphozyten (Abb. 1). Auch die antigene Stimulierung ist während der proliferativen Phase von Ca^{++} abhängig (DIAMANTSTEIN & ODENWALD 1974). Exogenes Ca^{++} ist demnach ein für die Proliferation von B- und T-Lymphozyten allgemein notwendiges Kation. Da Ca^{++} auch bei der Proliferation in verschiedenen anderen Zellsystemen in vivo und vitro eine Rolle spielt (WHITFIELD et al. 1973), wird diesem Kation eine besondere Bedeutung bei der Kontrolle der Proliferation auch von nichtlymphoiden Zellen zugesprochen.

Die Rolle von Ca^{++} bei der Aktivierung eines ruhenden Lymphozyten ist jedoch bis heute unklar. Die Bindung eines Mitogens an Membranrezeptoren ist Ca^{++} -unabhängig (WHITNEY & SUTHERLAND 1973a, RESCH et al. 1975). Der Ca^{++} Bedarf bezieht sich also auf einen späteren Schritt der Aktivierung. Da eine Zugabe des Chelatbildners EGTA zu mit PHA stimulierten Lymphozytenkulturen später als 12 h nach Kulturbeginn die Antwort von humanen Leukozyten nicht mehr hemmt, haben WHITNEY & SUTHERLAND 1972a angenommen, daß exogenes Ca^{++} nur während der frühen Aktivierungsphase notwendig ist. Unsere Untersuchungen zeigen, daß EGTA bis zu 12 h nach Kulturbeginn gegeben auf die Lymphozyten der Maus eine fast vollständig hemmende Wirkung hat. Die weiterführenden Untersuchungen sprechen jedoch gegen eine Interpretation im Sinne von WHITNEY & SUTHERLAND. Zum einen war die Antwort der Lymphozyten auf alle untersuchten B- und T-Zell Mitogene durch das Fehlen von Ca^{++} während der ersten 12 h der Kultur nur geringfügig verändert (Abb. 2). Erst wenn die Zellkulturen 24 h - 36 h ohne Ca^{++} gehalten wurden, war die Antwort vollständig unterdrückt. Auch verschiebt der zeitweilige Ca^{++} Mangel bis 12 h bzw. 24 h nach Kulturbeginn nicht den Zeitpunkt der maximalen DNA-Synthese in mit LPS stimulierten Milzzellen (Abb. 3). Diese Ergebnisse und die Untersuchungen von DIAMANTSTEIN & ODENWALD 1974, die zeigen, daß nur während der Proliferationsphase, aber nicht während der frühen Aktivierungsphase die antigene Stimulierung von Ca^{++} abhängig ist, lassen vermuten, daß Ca^{++} keinen Einfluß während der Initiierungsphase der Transformation von Lymphozyten hat. Erst in bereits aktivierten Zellen scheint es während des Teilungszyklusses zu einer Ca^{++} -abhängigen Phase(n) zu kommen.

Die Dauer der Aktivierungsphase von Lymphozyten nach Stimulierung mit Con A variiert von Zelle zu Zelle (GUNTHER et al. 1974). Wir meinen deshalb, daß der Verlauf der Kurven in Abbildung 2 durch die stets wachsende Anzahl der Zellen verursacht wird, die die postulierte Ca^{++} -abhängige Phase des Zell-

zyklusses passiert haben. Je später durch EGTA Ca^{++} aus den Kulturen entfernt worden ist, desto mehr Zellen haben die Ca^{++} -abhängige Phase bereits hinter sich und können den Zellzyklus fortsetzen, bzw. je später Ca^{++} zu den Kulturen gegeben worden ist je mehr Zellen sind durch das Fehlen des Kations in der von Ca^{++} abhängigen Phase arretiert worden.

Es soll an dieser Stelle aber nicht unerwähnt bleiben, daß diese Interpretation unserer Ergebnisse nicht in Übereinstimmung mit Untersuchungen anderer Autoren zu bringen ist. Sie fanden, daß exogenes Ca^{++} notwendig für die mitogeninduzierte Erhöhung der frühen RNA-Synthese ist (KAY 1971), ebenso wie für die erhöhte Aufnahme von α -Amino-Buttersäure (WHITNEY & SUTHERLAND 1973a) und für die Aktivierung des Stoffwechsels der Phospholipide der Membran (RESCH 1975). Daß die Erhöhung der Ca^{++} -Aufnahme von exogenem Ca^{++} abhängig ist, ist eine triviale Feststellung. Für diese Diskrepanz zu unseren Ergebnissen haben wir bis jetzt keine Erklärung, es sei denn, wir würden behaupten, all diese frühen Reaktionen finden zwar statt, sind aber keine notwendige Bedingung für eine Aktivierung von Lymphozyten während einer frühen Phase.

Von einigen Autoren wird die Meinung vertreten, daß ein erhöhter Ca^{++} -Influx das intrazelluläre Signal für eine Stimulierung der Differenzierung und Teilung von Lymphozyten sei (LUCKASEN et al. 1974, MAINO et al. 1974). Diese These wird durch folgende Fakten belegt:

1. Sehr kurz nach der Zugabe von PHA oder Con A zu Lymphozyten wird ein erhöhter Ca^{++} -Influx in die Zelle beobachtet (ALLWOOD et al. 1971, FREEDMANN et al. 1975, WHITNEY & SUTHERLAND 1972b).
2. Das Ca-Ionophore A 23187 stimuliert sowohl Blasttransformation, DNA-Synthese und Proliferation von Lymphozyten (LUCKASEN et al. 1974, MAINO et al. 1974) als auch frühe Ereignisse der Lymphozytentransformation wie Stoffwechsel der Phospholipide der Membran und die RNA-Synthese (RESCH et al. 1975), erhöhte Aufnahme von Aminosäuren (HOVI et al. 1975), Phosphorylierung von Proteinen (GREENE et al. 1975) und erhöhten Ca^{++} -Influx (NEELY et al. 1975). Schließlich wurde auch noch ein Einfluß auf die Konzentration von 3',5'-cGMP (HADDEN, persönliche Mitteilung) bzw. auf die 3',5'-cAMP Konzentration (GREENE et al. 1975) festgestellt. Das Ionophore, von dem bisher angenommen wurde, daß es seine Wirkung über den Transport von Ca^{++} durch die Zellmembran ausübt, löst bei der Aktivierung von Lymphozyten also offensichtlich die selben Reaktionen aus wie ein Mitogen.

Im Zusammenhang mit Punkt 1 muß entsprechend der aufgestellten These gefordert werden, daß eine spezifische Korrelation zwischen Stimulierung der Ca^{++} -Auf-

nahme und der Proliferation besteht. FREEDMAN et al. 1975 fanden, daß Con A hinsichtlich der Aktivierung der Ca^{++} -Aufnahme spezifisch auf T-Lymphozyten wirkt. Auf der anderen Seite konnten sie jedoch keine erhöhte Ca^{++} -Aufnahme nach Stimulierung von B-Lymphozyten mit LPS oder PWM feststellen, obwohl auch die mitogene Stimulierung von B-Zellen Ca^{++} -abhängig ist, wie unsere Ergebnisse zeigen. Somit scheint die erhöhte Ca^{++} -Aufnahme nur bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine Rolle zu spielen. Dies ist mit der These, daß der erhöhte Ca^{++} -Influx ein generelles Signal der mitogenen Stimulierung sei, nicht vereinbar.

Für eine mögliche Rolle von Ca^{++} als "second messenger" bei der Stimulierung von Lymphozyten spricht auch die mitogene Eigenschaft des Ca-Ionophores. In diesem Zusammenhang muß jedoch von dem Ionophore verlangt werden, daß es nur über den Transport von Ca^{++} und nur direkt seinen mitogenen Einfluß auf die Lymphozyten ausübt. Wie in unseren Ergebnissen gezeigt wird, stimuliert A 23187 die DNA-Synthese von Milzzellen der Maus (Abb. 22). Diese Stimulierung ist jedoch von der Anwesenheit von Helferzellen, wahrscheinlich Makrophagen, abhängig (Tab. 35) und wird zumindest zum Teil durch einen löslichen Faktor (LAF) aus diesen Makrophagen vermittelt. Dieser Faktor erst ist für die erhöhte DNA-Synthese verantwortlich (Tab. 23). Die Stimulierung der Produktion dieses Faktors durch A 23187 ist unabhängig von exogenen Ca^{++} (Tab. 37). Da die Stimulierung von Lymphozyten sowohl durch ein Mitogen als auch durch LAF von Ca^{++} abhängig ist (Tab. 33), erstaunt es nicht, daß die Wirkung des Ionophores auf die Aktivierung von Lymphozyten ebenfalls Ca^{++} -abhängig ist (LUCKASEN et al. 1974).

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Stimulierung der Lymphozyten in Milzzellkulturen der Maus durch das Ionophore nicht über den Transport von Ca-Ionen durch die Zellmembran ausgelöst wird. Diese Ansicht fand inzwischen ihre Bestätigung. Durch einen Überschuß von Mg^{++} oder Str^{++} im Medium von Lymphozytenkulturen wurden die Bindungsstellen des Ionophores für Ca^{++} blockiert. Auch unter diesen Bedingungen wurde eine Stimulierung der DNA-Synthese dieser Zellen durch A 23187 gefunden (RESCH, persönliche Mitteilung). Wir meinen deshalb, daß die Wirkung des Ca-Ionophores nicht über eine Erhöhung des Ca^{++} -Influses verursacht wird.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, daß Ca^{++} kein "second messenger" der mitogenen und antigenen Stimulierung ist. Nach einer Initiierungsphase scheint es jedoch einen von Ca^{++} abhängigen Schritt zu geben, über den Ca^{++} eine Regulierungsmöglichkeit auf die mitogene und antigene Stimulierung der

Proliferation hat. Wir meinen, daß diese Regulierung als ein einseitig gerichtetes System über eine Inhibierung durch das Fehlen des Kations geschieht, bzw. über ein passieren lassen eines vorhandenen Signals bei der Anwesenheit von Ca^{++} .

In Bezug auf das Ca-Ionophore zeigen unsere Ergebnisse, daß die Tatsache, daß eine Antwort einer Zelle von Ca^{++} abhängig ist und sich durch das Ionophore stimulieren läßt, noch nicht ausreichend für die Annahme der These ist, daß allein eine erhöhte Ca^{++} -Aufnahme die Antwort dieser Zelle auslösen kann.

4.2. Die Wirkung von zyklischen und nicht-zyklischen Nukleotiden auf die Aktivierung von Lymphozyten

Nach Bindung eines entsprechenden Mitogens an Rezeptoren der Zellmembran erhöht sich die intrazelluläre Konzentration von 3',5'-cGMP sowohl in T-Lymphozyten (HADDEN et al. 1972) als auch in B-Lymphozyten (WATSON 1975). Das Niveau von 3',5'-cAMP dagegen bleibt unverändert (HADDEN et al. 1972, DERUBERTIS et al. 1974, NOVOGRODSKY & KATCHALSKI 1970). Außerdem erhöht exogenes 3',5'-cGMP die Immunantwort in vitro (WATSON 1973), wogegen eine hohe Konzentration von exogenem 3',5'-cAMP eine inhibierende Wirkung sowohl auf die antigene (BÖSING-SCHNEIDER 1975, WATSON 1973) wie auch auf die mitogene Stimulierung hat (GALLO & WHANG-PENG 1971, HIRSCHHORN et al. 1970, MENDELSON et al. 1973, SMITH et al. 1973). Diese Resultate führten zu der These, daß 3',5'-cGMP ein "second messenger" für die intrazelluläre Vermittlung eines antigenen und mitogenen Signals ist, und daß beide Nukleotide eine antagonistische Wirkung auf die Aktivierung von Lymphozyten haben, wie in der Yin-Yan-Hypothese von GOLDBERG beschrieben wurde (HADDEN et al. 1974).

Im Hinblick auf diese These scheinen unsere Ergebnisse zunächst eine solche Rolle von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP zu bestätigen. Exogenes 3',5'-cGMP kann die DNA-Synthese in ruhenden Lymphozyten stimulieren, wie an der Erhöhung des Thymidineinbaus in Kulturen von Lymphozyten der Maus zu sehen ist (Abb. 4). Diese Ergebnisse sind von anderen bestätigt worden (GILETTE et al. 1974, WATSON 1975, WEINSTEIN et al. 1974). 3',5'-cAMP dagegen zeigt ausschließlich eine inhibierende Wirkung sowohl in unstimulierten als auch in mit PHA stimulierten Milzzellkulturen (Abb. 4 und 5). Eine Aktivierung von Lymphozyten durch 3',5'-cAMP auch bei niedrigen Konzentrationen kann im Gegensatz zu anderen Untersuchungen (GALLO & WANG PENG 1971, HIRSCHHORN et al. 1970, MCCRERY & RIGBY 1971, SMITH et al. 1971b) hier nicht nachgewiesen werden (Abb. 6).

Diese Inhibierung der mitogenen Stimulierung wird auch bei der Verwendung anderer Mitogene und anderer Zellpopulationen gefunden (Abb. 8). Die Stärke der Hemmung scheint dabei mehr von der Zellpopulation als von der Art des benutzten Mitogens abzuhängen. So inhibiert 3',5'-cAMP in Milzzellen von BALB/c Mäusen die Antwort auf Con A um 96%. In Thymuszellen dagegen wird die Antwort nur um ca. 50% reduziert. Obwohl also diese Hemmung ein allgemeines Phänomen bei der mitogenen Stimulierung von Lymphozyten zu sein scheint, liegen gewisse Spezifitäten der Wirkung von 3',5'-cAMP vor.

Unter der Annahme, daß 3',5'-cAMP die Zellmembran passiert und intrazellulär wirkt, mögen die gefundenen Differenzen durch eine unterschiedliche Permeabilität der Zellmembran für 3',5'-cAMP bei verschiedenen Zellpopulationen verursacht sein. Es sind jedoch Bindungsstellen für 3',5'-cAMP an der Oberfläche der Zellmembran von Lymphozyten bekannt (MACMANUS & WHITFIELD 1972). Man kann deshalb nicht ausschließen, daß exogenes 3',5'-cAMP über Membranbestandteile wirkt. In diesem Fall könnte die Anzahl der Bindungsstellen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen Lymphozytenpopulationen für exogenes 3',5'-cAMP verantwortlich sein.

Die Inhibierung der Proliferation durch 3',5'-cAMP ist sowohl bei Lymphozyten der verschiedensten Herkunft zu beobachten (GALLO & WANG-PENG 1971, HIRSCHHORN et al. 1970, MENDELSON et al. 1973, SMITH et al. 1971b), als auch bei der Proliferation nicht-lymphoider Zellen (BOMBIK & BURGER 1973, BURGER et al. 1972, KURTZ et al. 1974). Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von 3',5'-cAMP erhöhen, wie z.B. Theophyllin oder PG E₁, wirken ebenfalls als Hemmer der Proliferation (HADDEN et al. 1970, HIRSCHHORN et al. 1970, KURTZ et al. 1974, MENDELSON et al. 1973, OTTEN et al. 1972, RUDLAND et al. 1974). Außerdem ist die Konzentration von 3',5'-cAMP in arretierten Zellen auch nicht-lymphoider Art hoch im Vergleich zu sich teilenden Zellen (BURGER et al. 1972, OTTEN et al. 1972, RUDLAND et al. 1974, SHEPPARD 1974). Wir glauben deshalb, daß 3',5'-cAMP inhibierend an der Regulation der Proliferation von Zellen beteiligt ist. Auf welche Art und Weise 3',5'-cAMP die Inhibition der Proliferation bewirkt, ist allerdings unbekannt. Es liegen aber Untersuchungen vor über Effekte von 3',5'-cAMP, die möglicherweise bei der Regulierung der Proliferation der Zelle eine Rolle spielen. So inhibiert 3',5'-cAMP die Proteinsynthese in einem zellfreien System (SELLERS et al. 1974) ebenso wie die Fett- und Cholesterolsynthese unter den Bedingungen einer erhöhten Gluconeogenese. Bei der Phosphorylierung von Kern-Proteinen zeigt 3',5'-cAMP inhibierende Eigenschaften durch den Einfluß auf bestimmte Protein-

kinasen (JOHNSON & HADDEN 1975, KISH & KLEINSMITH 1974, RIKANS & RUDDON 1973). Auch ist ein Einfluß von 3',5'-cAMP auf die Zusammensetzung der Mikrotubuli und Mikrofilamente bekannt (GILLESPIE 1974, WILLINGHAM & PASTAN 1975), der antagonistisch zu dem durch 3',5'-cGMP verursachten ist (OLIVER 1975).

Ein direkter Zusammenhang all dieser Effekte mit der Zellproliferation ist noch nicht nachgewiesen, aber wahrscheinlich. Auch ist nicht bekannt, ob die hier beschriebenen Effekte tatsächlich unter der physiologischen Bedingung der Hemmung der mitogenen Stimulierung von Lymphozyten stattfinden. So bleibt die Vermutung einer möglichen Verknüpfung bei der Wirkung von 3',5'-cAMP auf die Zellproliferation spekulativ.

Neben 3',5'-cGMP stimulieren auch GDP und 2',3'-cGMP die DNA-Synthese (Tab. 6a, c), die Lymphozytentransformation und die Proliferation in Milzzellkulturen (Abb. 11). Alle anderen getesteten Nukleoside und Nukleotide zeigen keinen stimulierenden Effekt auf ruhende Lymphozyten, hemmen aber die Antwort von Milzzellen auf LPS (Tab. 6a, b, c, 7a, b, c). Für db-cGMP und 8Br-cGMP ist dies erstaunlich, da allgemein angenommen wird, daß Derivate der zyklischen Nukleotide eine ähnliche Wirkung wie die zyklischen Nukleotide selbst haben. Sie werden oft benutzt, da sie leichter die Zellmembran passieren können als das eigentliche Nukleotid und außerdem widerstandsfähiger gegen die abbauende Phosphodiesterase sind (ROBISON et al. 1971). WEINSTEIN et al. 1974 fanden sogar eine bessere Stimulierung der DNA-Synthese von Milzzellen der Maus durch diese Derivate als durch 3',5'-cGMP selbst. Für diese Diskrepanz haben wir keine Erklärung.

Der Mechanismus der hemmenden Wirkung der in Tabelle 6 und 7 untersuchten Nukleotide auf die mitogene Stimulierung ist unklar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß sie bei genügend hoher Konzentration die Viabilität der Zellen herabsetzen. Wir haben diese Möglichkeit nicht getestet. Sowohl Adenosin als auch Adenin- und Guanin-Nukleotide sollen eine aktivierende Wirkung auf die Adenylzyklase haben (CLAR & GROSS 1974, GOLDFINE et al. 1974, HARWOOD et al. 1973, WOLF & COOK 1973). So wäre es möglich, daß diese Nukleotide ihre inhibierende Wirkung über eine Aktivierung der Adenylzyklase ausüben.

Inhibitoren der 3',5'-cAMP-Phosphodiesterase (Theophyllin und Papaverin) und auch PG E₂ (ein Aktivator der Adenylzyklase) zeigen keine Aktivierung, wohl aber eine Hemmung der DNA-Synthese in mit LPS stimulierten Lymphozyten (Tab. 9a, b). Derartige Ergebnisse sind auch von anderen beschrieben worden. Sie stehen in Übereinstimmung mit der These, daß solche Substanzen ebenso wie

3',5'-cAMP selbst wirken (HADDEN et al. 1970, HIRSCHHORN et al. 1970, KURTZ et al. 1974, MENDELSON et al. 1973, OTTEN et al. 1972, RUDLAND et al. 1974).

Acetylcholin und PG $F_{2\alpha}$ erhöhen beide die intrazelluläre Konzentration von 3',5'-cGMP durch die Aktivierung der Guanylylzyklase (GOLDBERG et al. 1973, KUEHL 1974). Entsprechend den Kriterien von E.W. SUTHERLAND müßten diese Substanzen imstande sein, ähnlich wie 3',5'-cGMP selbst die Lymphozyten zu aktivieren. HADDEN et al. 1974 fanden eine Erhöhung der Protein-, RNA- und DNA-Synthese in mitogen stimulierten Lymphozyten durch Acetylcholin. Aber die Effekte waren nur sehr klein. In unstimulierten Lymphozyten ließen sich nur die Protein- und die RNA-Synthese, aber nicht die DNA-Synthese aktivieren. Auch in nicht ruhenden Thymuszellen erhöht Acetylcholin die DNA-Synthese und auch die Proliferation der Lymphozyten. Dieser Effekt konnte durch Theophyllin gehemmt werden (MACMANUS et al. 1975). Unsere Ergebnisse zeigen dagegen nur inhibierende Effekte von Acetylcholin und PG $F_{2\alpha}$, auch wenn der Abbau des Acetylcholins durch Eserin gehemmt wurde.

Unsere Ansicht nach sind unter den untersuchten Bedingungen die Veränderungen der intrazellulären Konzentration von 3',5'-cGMP durch Acetylcholin und PG E_2 hinsichtlich der zeitlichen Dauer und/oder Höhe nicht ausreichend, um Effekte zu erzielen, wie sie durch exogenes 3',5'-cGMP verursacht werden. Eine Stabilisierung der Konzentration von 3',5'-cGMP durch einen spezifischen Phosphodiesterase-Hemmer ist auch nicht möglich, da ein solcher Hemmer noch nicht bekannt ist.

WATSON 1973 fand eine antagonistische Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP. 3',5'-cAMP hemmt die Immunantwort, 3',5'-cGMP dagegen konnte die Immunantwort erhöhen und die Hemmung von 3',5'-cAMP zumindest teilweise aufheben. Er nahm deshalb an, daß 3',5'-cGMP ein Signal sei, das in antigen stimulierten B-Lymphozyten die Antikörpersynthese aktiviere, 3',5'-cAMP dagegen sei das Signal, das in antigen stimulierten B-Lymphozyten Toleranz induziere.

Von unseren Ergebnissen ausgehend meinen wir, daß die Wirkung der beiden zyklischen Nukleotide auf die Immunantwort durch ihre Wirkung auf die Proliferation erklärt werden kann. 3',5'-cGMP hebt zumindest teilweise die hemmende Wirkung von 3',5'-cAMP auf die mitogene Aktivierung von Lymphozyten auf. Diese Wirkung ist dosisabhängig (Abb. 13) und kann in allen untersuchten Lymphozytenpopulationen nachgewiesen werden (Abb. 14). LPS und DS stimulieren verschiedene Subpopulationen von B-Zellen (DIAMANTSTEIN et al. 1974), GRONOWICZ et al. 1974), Con A und PHA verschiedene Subpopulationen von T-Zellen (STOBO &

PAUL 1973). Demnach haben also 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP eine antagonistische Wirkung auf die Aktivierung in den verschiedensten Subpopulationen von B- und T-Lymphozyten. In Milzzellen allerdings wird die durch 3',5'-cAMP gehemmte Antwort der Zellen auf LPS und DS durch 3',5'-cGMP besser wieder hergestellt als die Antwort auf PHA und Con A, und in Kulturen aus "Nude" Milzzellen übertrifft die mitogene Antwort der Lymphozyten in Gegenwart von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP die ursprüngliche Antwort auf das Mitogen allein um bis zu 150%. 3',5'-cGMP scheint also der Hemmung der Proliferation durch 3',5'-cAMP von Lymphozyten besser entgegenwirken zu können als der Hemmung von T-Lymphozyten.

Nicht nur 3',5'-cGMP, sondern auch GDP zeigt eine zu 3',5'-cAMP antagonistische Wirkung (Abb. 13). In fast allen getesteten Lymphozytenpopulationen konnte GDP die Hemmung mit 3',5'-cAMP wieder aufheben. GDP zeigte dabei ähnliche Spezifitäten hinsichtlich der Lymphozytenpopulationen wie 3',5'-cGMP. Allerdings war seine Wirkung in allen getesteten Kulturen niedriger als die von 3',5'-cGMP, und die Hemmung der mitogenen Antwort von Knochenmarkszellen blieb durch GDP gänzlich unbeeinflusst (Abb. 14).

Im Gegensatz zu 3',5'-cGMP und GDP konnten wir mit 2',3'-cGMP keine antagonistische Wirkung zu 3',5'-cAMP feststellen (Tab. 12).

Die Hemmung der mitogenen Stimulierung von Lymphozyten durch 3',5'-cAMP scheint ein spezifischer Mechanismus zu sein: Die Hemmung der Lymphozytentransformation durch Adenosin und andere zyklische und nicht-zyklische Adenin-Nukleotide wird durch 3',5'-cGMP im Gegensatz zur Hemmung durch 3',5'-cAMP nicht beeinflusst (Tab. 13). 3',5'-cGMP ist auch wirkungslos auf den inhibierenden Effekt von Papaverin, Theophyllin und PG E₂. Für Adenosin, AMP, ADP, ATP und auch für 2',3'-cAMP ist dies durch andere Spezifitäten erklärbar. Die Derivate von 3',5'-cAMP, db-cAMP und 8Br-cAMP sollten allerdings ähnlich wie 3',5'-cAMP wirken (ROBISON et al. 1971), und von Papaverin, Theophyllin und PG E₂ nimmt man an, daß sie über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von 3',5'-cAMP ihre Effekte auslösen. Das Fehlen einer antagonistischen Wirkung von 3',5'-cGMP könnte durch eine zytotoxische Wirkung dieser Substanzen erklärt werden. Diese Möglichkeit ist nicht geprüft worden. Auch wäre denkbar, daß diese Substanzen neben ihrem Effekt auf die Konzentration von 3',5'-cAMP noch weitere inhibierende Einflüsse auf die Proliferation von Lymphozyten haben, die nicht im Zusammenhang mit 3',5'-cAMP stehen. So hemmt z.B. Theophyllin auch die DNA-Polymerase (WRAGG et al. 1967).

Die Art und Weise der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP ist nicht bekannt. Bei der Ähnlichkeit der beiden Substanzen könnte man eine kompetitive Reaktion vermuten. Wenn man annimmt, daß die beiden Nukleotide intrazellulär wirken, könnte eine Konkurrenz um die Bindungsstelle einer Proteinkinase, die die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP vermittelt, eine Erklärungsmöglichkeit sein. Eine solche Interferenz des 3',5'-cGMP und des 3',5'-cAMP um die Bindungsstelle der von zyklischen Nukleotiden abhängigen Proteinkinasen ist auch bekannt (GILLMAN 1970, GOLDBERG et al. 1973, KUO 1974). Sie ist aber zu gering, um eine physiologische Bedeutung zu haben, da die jeweiligen Proteinkinasen hochspezifisch entweder für 3',5'-cAMP oder für 3',5'-cGMP sind.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre die Annahme einer stimulierenden Wirkung von 3',5'-cGMP auf die 3',5'-cAMP-Phosphodiesterase, wie sie im zellfreien System bekannt ist. (KLOTZ & STOCK 1972). Bei Thymuszellen wurde allerdings ein inhibierender Effekt von 3',5'-cGMP auf die Phosphodiesterase festgestellt (WHITFIELD et al. 1971).

3',5'-cGMP und 3',5'-cAMP aktivieren jeweils eine andere spezifische Proteinkinase. Diese können dann gegenläufige Reaktionen auslösen. Dies ist vermutlich bei der Wirkung dieser beiden zyklischen Nukleotide auf kontraktile Bestandteile der Zelle der Fall. So erhöht 3',5'-cGMP die Polymerisation der Mikrotubuli, wogegen 3',5'-cAMP ähnlich wie Colchicin eine Polymerisation verhindert (OLIVER 1975). Es wird vermutet, daß Mikrotubuli an der Wechselwirkung zwischen Membranrezeptoren und Zytoplasma beteiligt sind, und so hat eine Veränderung ihrer Struktur einen Einfluß auf die Aktivierung von Lymphozyten (EDELMAN et al. 1973). So wäre es möglich, daß der Einfluß der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP auf die mitogene Stimulierung über diese Zellstrukturen ausgeübt wird.

Die Wirkung von 3',5'-cAMP auf die mitogene Antwort der Lymphozyten sinkt nahezu linear mit dem Zeitpunkt der Zugabe des Nukleotids zu den Kulturen (Abb. 15). Der Effekt von 3',5'-cGMP auf die durch 3',5'-cAMP verursachte Hemmung dagegen fällt mit dem Zeitpunkt der Zugabe zu den Kulturen schnell ab. 3',5'-cGMP ist wirkungslos auf die Proliferation in durch 3',5'-cAMP gehemmten Kulturen, wenn es später als 12 h nach Kulturbeginn zugegeben wird (Abb. 16). Dieser nicht lineare Verlauf der Kurve läßt vermuten, daß 3',5'-cGMP während einer frühen Phase (weniger als 12 h nach mitogener Stimulierung) seine aktivierende Wirkung ausübt. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß 3',5'-cAMP in einer

Reaktionskette Prozesse auslöst oder verhindert, die nur bis zu einem bestimmten Zeitpunkt durch 3',5'-cGMP reversibel sind. Ist dieser Punkt überschritten, hat 3',5'-cGMP keinen Einfluß mehr auf die Proliferation der Zellen.

Milzzellen von BALB/c Mäusen lassen sich sowohl durch 3',5'-cGMP als auch durch GDP und 2',3'-cGMP stimulieren (Tab. 11). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aber, daß bei ihrer Wirkung auf die Proliferation von Lymphozyten sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede bestehen:

1. 3',5'-cAMP hemmt die Antwort von Milzzellen der Maus auf 3',5'-cGMP, GDP und auch von 2',3'-cGMP. Hinsichtlich der Stärke der Hemmung gibt es jedoch Unterschiede bei den drei Guanin-Nukleotiden. Wie Abbildung 12 zeigt, ist eine 3',5'-cAMP-Konzentration von ca. $2 \times 10^{-4} M$ dafür ausreichend, sowohl die Antwort von Milzzellen auf 2',3'-cGMP als auch auf die beiden Mitogene LPS und PHA um 50% zu hemmen. Für eine 50%ige Hemmung der GDP- und 3',5'-cGMP-Antwort dagegen wird eine 10fache Dosis von 3',5'-cAMP benötigt.

2. Bei der Verwendung unterschiedlicher Zellpopulationen fällt die Antwort der Lymphozyten auf eine Stimulation mit den Guanin-Nukleotiden verschieden aus. GDP stimuliert Knochenmarkszellen und Milzzellen von BALB/c Mäusen und Milzzellen von Nude Mäusen in einer ähnlichen Größenordnung wie 3',5'-cGMP, beide Nukleotide erhöhen die DNA-Synthese in Thymus- und Lymphknotenzellen von BALB/c Mäusen nur gering (Abb. 7, 10). In den Knochenmarkszellen und Nude Milzzellen ist die maximale Antwort der Zellen auf GDP jedoch niedriger als auf 3',5'-cGMP. Wie aus der Dosis-Effekt-Kurve zu entnehmen ist, kann dies durch die inhibierende Wirkung von GDP bei höheren Konzentrationen verursacht sein. Die Ursache der Hemmung durch GDP ist unbekannt.

Der Effekt von 2',3'-cGMP auf Thymus- und Lymphknotenzellen ist ebenfalls gering, und die DNA-Synthese von Knochenmarkszellen und von Milzzellen der Nude Maus wird durch 2',3'-cGMP in einer mit der Antwort auf 3',5'-cGMP vergleichbaren Höhe stimuliert (Abb. 11). Die Antwort von BALB/c Milzzellen auf die Stimulation mit 2',3'-cGMP ist dagegen extrem gesteigert. Diese Zellen zeigen von allen untersuchten Populationen die bei weitem stärkste Antwort auf 2',3'-cGMP. Sie ist bis zu 10 mal höher als die Reaktion auf 3',5'-cGMP.

3. 3',5'-cGMP und GDP können beide die inhibierende Wirkung von 3',5'-cAMP auf die mitogene Stimulierung zumindest teilweise aufheben. Bei allen untersuchten Mitogenen und Zellpopulationen ist die Wirkung von GDP geringer als von 3',5'-cGMP (Abb. 14).

Alle hier gezeigten Unterschiede hinsichtlich des Einflusses von 3',5'-cGMP und GDP auf die Proliferation von Lymphozyten scheinen uns eher quantitativer als qualitativer Natur zu sein. Wir nehmen deshalb an, daß 3',5'-cGMP und GDP einen zumindest ähnlichen Mechanismus bei der Ausübung ihrer Wirkung benutzen. Wo und wie GDP in die selbe Reaktionskette wie 3',5'-cGMP eingreift, ist nicht bekannt.

Die Wirkung von 2',3'-cGMP auf die Proliferation der untersuchten Zellen scheint jedoch qualitativ von anderer Natur zu sein wie die von 3',5'-cGMP.

Eine Stimulierung von Lymphozyten durch jedes der drei Guanin-Nukleotide wurde in allen den Zellpopulationen gefunden, die sich gut mit einem B-Zell-Mitogen stimulieren lassen. Keine oder nur eine geringe Antwort wurde in Thymus- und Lymphknotenzellen gefunden. Beide Zellpopulationen antworten nur schlecht (Lymphknotenzellen) oder gar nicht (Thymuszellen) auf ein B-Zell-Mitogen. Aus dieser Sicht nahmen wir zunächst an, daß sämtliche drei Guanin-Nukleotide B-Lymphozyten stimulieren, 2',3'-cGMP aber auf eine andere Subpopulation wirkt als 3',5'-cGMP und GDP.

Die Vermutung, daß 3',5'-cGMP spezifisch ist für bestimmte Lymphozytenpopulationen, ist nicht vereinbar mit der These, daß dieses zyklische Nukleotid als "second messenger" der mitogenen Stimulierung aller Lymphozyten wirkt. Unter der Voraussetzung, daß die Nukleotide intrazellulär wirken, kann eine unterschiedliche Permeabilität der Zellmembran für 3',5'-cGMP bei verschiedenen Lymphozytenpopulationen für eine solche Spezifität verantwortlich sein. Außerdem sind die untersuchten Zellpopulationen nicht nur verschieden hinsichtlich ihrer Lymphozytenpopulationen, sondern sie differieren auch in der Zusammensetzung und der Anzahl der nicht-lymphoiden Zellen. Wir untersuchten deshalb, inwieweit diese nicht-lymphoiden Zellen eine Rolle bei der Stimulierung der Lymphozyten durch die Guanin-Nukleotide spielen, wie es z.B. für die antigene Stimulierung beschrieben wurde (MOSIER 1967).

Nach der Auftrennung der Milzzellpopulation mit Hilfe der verschiedenen Methoden können wir annehmen, daß die gereinigte Zellsuspension aus folgenden Populationen besteht:

1. Im Eluat einer Glasperlen-Säule finden wir ca. 1% - 4% Makrophagen gegenüber ca. 10% in der ursprünglichen Milzzellpopulation (Tab. 1). Die Zusammensetzung der Lymphozyten in ihren verschiedenen Subpopulationen wird dagegen nur wenig verändert (SHORTMAN 1971). Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß die Anzahl der B-Zellen geringfügig erniedrigt ist.

2. Für die Zusammensetzung der Zellpopulation nach einer Auftrennung durch Behandlung mit LSR (Tab. 3) gilt das selbe, wie unter Punkt 1 gesagt wurde.

3. Das Eluat einer mit Milzzellen beschickten Nylonwolle-Säule besteht aus knapp 1% Makrophagen (Tab. 2). Auch die Zusammensetzung der Lymphozyten wird gegenüber der ursprünglichen Milzzellpopulation verändert: man findet keine oder nur noch einzelne B-Lymphozyten (JULIUS et al. 1973).

4. PZ bestehen zu 80% - 90% aus Makrophagen (Tab. 4), so daß nach einer Zugabe von 5% - 10% PZ zu einer gereinigten Milzzellpopulation wieder die gleiche Menge an Makrophagen wie in der ursprünglichen Population zu finden ist.

Wenn aus einer Milzzellpopulation die Makrophagen durch die Passage durch eine Glasperlen-Säule entfernt wurden, so ist die Antwort dieser Zellen auf eine Stimulation mit 2',3'-cGMP nur wenig verändert. Auch ein Ersetzen der adhärennten Zellen durch 5% oder 10% PZ hat nur eine geringe Auswirkung (Tab. 14). Die Zellpopulation im Eluat einer mit Milzzellen beschickten Nylonwolle-Säule, die arm an Makrophagen und B-Zellen ist, läßt sich dagegen nicht mehr mit 2',3'-cGMP stimulieren (Tab. 15). Nach einem Zusatz von 5% oder 10% PZ zu dieser Zellpopulation wird zwar wieder eine geringe Stimulierung durch das Nukleotid gefunden, die Antwort erreicht aber bei weitem nicht die ursprüngliche Höhe. Auch auf die Stimulierung von Thymuszellen mit 2',3'-cGMP haben PZ einen positiven Einfluß (Tab. 16). Diese Wirkung der PZ auf die Stimulierung von T-Lymphozyten mit 2',3'-cGMP ist nicht durch die Produktion eines löslichen Faktors (LAF) durch die PZ erklärbar, da 2',3'-cGMP die Produktion dieses Faktors nicht stimuliert (Abb. 17).

Diese Untersuchungen und die in Abbildung 11 gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, daß 2',3'-cGMP vornehmlich als Aktivator von B-Lymphozyten wirkt. Die Stimulierung dieser Lymphozytenpopulation durch 2',3'-cGMP ist nicht abhängig von der Existenz von Helferzellen. Es wird außerdem noch eine geringe, von Makrophagen abhängige Stimulierung von T-Lymphozyten gefunden. Da 2',3'-cGMP die Produktion von LAF nicht stimuliert, bleibt die Art und Weise der Wirkung der Makrophagen unklar.

2',3'-cGMP könnte einmal mit unspezifischen Membranbestandteilen reagieren und dadurch die Aktivierung der Lymphozyten auslösen. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, daß es die Zellmembran passiert und seine Wirkung intrazellulär entfaltet. Da wir keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt haben, können wir keine Aussage darüber machen, welche der beiden Möglichkeiten verwirklicht wird.

Mit allen untersuchten gereinigten Milzzellpopulationen war die Antwort auf 3',5'-cGMP oder GDP niedriger als in der ursprünglichen Population bzw.

sie fehlte völlig. 5% oder 10% PZ konnten in diesen gereinigten Milzzellpopulationen die ursprüngliche Antwort wieder herstellen oder sogar über diese hinaus steigern (Tab. 14, 15, 18). Auch die schwache Antwort von Thymuszellen auf diese Guanin-Nukleotide konnte deutlich erhöht werden (Tab. 16). Daß diese Erhöhung der DNA-Synthese in den Kulturen mit einem Zusatz von PZ nicht in den PZ selbst geschieht, kann aus den Ergebnissen in Tabelle 19 geschlossen werden. Wir nehmen daher an, daß 3',5'-cGMP und GDP beide die DNA-Synthese von T-Lymphozyten stimulieren, dazu aber eine ausreichende Menge von Makrophagen benötigen.

3',5'-cGMP und GDP stimulieren beide die Produktion eines Lymphozyten aktivierenden Faktors (LAF), der von PZ in das Kulturmedium sezerniert wird (Abb. 17). Wir glauben, daß die Aktivierung der T-Lymphozyten in unserem System durch die beiden Nukleotide durch die Stimulierung der Produktion eines LAF in Makrophagen vermittelt wird.

Die verbliebene Restantwort der Milzzellen, die eine Glasperlen-Säule passiert haben oder mit Hilfe von LSR gereinigt worden sind, kann durch eine direkte Stimulierung von B-Lymphozyten verursacht sein. Wegen der noch vorhandenen geringen Anzahl an Makrophagen kann sie aber auch eine durch LAF vermittelte Stimulierung von B- oder T-Lymphozyten sein. Da es neben den B-Lymphozyten in der Milz der Nude Maus auch unreife, nicht funktionsfähige T-Lymphozyten gibt, muß die in Abbildung 7 und 10 gefundene Antwort von Nude Milzzellen nicht notwendigerweise auf B-Lymphozyten bezogen sein.

Da wir keine Ergebnisse über die Wirkung von 3',5'-cGMP und GDP und LAF auf eine reine B-Zell-Population haben, kann hier keine Aussage über den Effekt dieser beiden Nukleotide in dieser Zellpopulation gemacht werden.

Die Stimulierung der Produktion von LAF kann nicht die einzige Wirkung von 3',5'-cGMP und GDP hinsichtlich der Aktivierung von Lymphozyten sein.

3',5'-cGMP und GDP können beide die Wirkung von 3',5'-cAMP zumindest teilweise aufheben. Im Gegensatz dazu haben das Ca-Ionophore A 23187, das ebenfalls die LAF-Produktion stimuliert (Tab. 35), und auch LAF selbst keinen Einfluß auf diese Hemmung (Tab. 38).

Für die Art und Weise der Wirkung von 3',5'-cGMP und GDP auf die Lymphozytentransformation gibt es also offensichtlich mindestens zwei Möglichkeiten. Wie die Ergebnisse gezeigt haben, ist die Stimulierung von ruhenden Lymphozyten durch 3',5'-cGMP und GDP zumindest teilweise abhängig von Makrophagen und wird vermutlich durch einen löslichen Faktor von diesen Makrophagen ausgelöst.

In dieser einen Möglichkeit ist die Wirkung der Nukleotide also nicht direkt auf die Lymphozyten gerichtet.

Die Stimulierung der Produktion von LAF ist jedoch nicht geeignet für die Erklärung der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP. In diesem Fall vermuten wir eine direkte Wirkung auf die mitogene Stimulierung der Zellen.

Wir meinen, daß unsere Ergebnisse nicht die These unterstützen können, daß 3',5'-cGMP als ein "second messenger" der mitogenen Stimulierung wirkt. Denn obwohl dieses Nukleotid die DNA-Synthese in ruhenden Lymphozyten erhöht, ist nach unseren Untersuchungen eine direkte Stimulierung der Proliferation zumindest von T-Lymphozyten durch 3',5'-cGMP nicht möglich. Wie jedoch an der antagonistischen Wirkung von 3',5'-cAMP und 3',5'-cGMP gezeigt wird, schließt dies nicht eine Beteiligung dieser beiden Nukleotide an der Regulierung der Transformation sowohl für B- als auch für T-Lymphozyten aus. In diesem Fall hat 3',5'-cGMP offensichtlich eine direkte Wirkung in allen getesteten Lymphozytenpopulationen.

4.3. Die Produktion von löslichen Faktoren in PZ-Kulturen

Die Stimulierung von nichtadhärenten Milzzellen durch 3',5'-cGMP und GDP ist zumindest teilweise abhängig von PZ bzw. Makrophagen (Tab. 14 und 15). Wir prüften deswegen die Möglichkeit, ob dieser Effekt durch einen löslichen Faktor aus diesen Zellen vermittelt wird. Die Ergebnisse zeigen, daß der SUP von PZ Kulturen, die in Gegenwart von 3',5'-cGMP oder GDP inkubiert wurden, die DNA-Synthese in ruhenden Thymuszellen (Abb. 17) und in ruhenden Milzzellen (Tab. 22) syngener Mäuse erhöht. Der SUP von unstimulierten PZ-Kulturen zeigte dagegen unter diesen Bedingungen keinen Effekt. Der aktive Überstand stimuliert aber nicht nur die DNA-Synthese in ruhenden Lymphozyten, sondern erhöht ebenfalls die Antwort von Thymuszellen auf die Stimulierung mit PHA und Con A (Tab. 23). Wegen des stimulierenden Effektes von 3',5'-cGMP auf die Abgabe des aktivierenden Faktors nehmen wir an, daß dieser Faktor für die Stimulierung der nichtadhärenten Milzzellen in Gegenwart von PZ verantwortlich ist.

Dieser aktivierende Faktor ist vermutlich identisch mit dem, der von anderen gefunden worden ist (CALDERON & UNANUE 1975, GERY et al. 1972, KELLER 1975, WALDMAN & GOTTLIEB 1973, YOSHINAGA et al. 1975). GERY et al. 1972 schlug als Bezeichnung dieses Faktors "lymphocyte-activating factor" (LAF) vor. Wir können hier nun zeigen, daß 3',5'-cGMP an der Produktion dieses Faktors beteiligt ist.

LAF ist ein nicht dialysierbarer Faktor (CALDERON & UNANUE 1975, GERY & HANDSCHUHMACHER 1974). Neben diesen aktivierenden Bestandteilen werden in den SUPs von PZ-Kulturen auch die Proliferation von Lymphozyten inhibierende Faktoren (LIF) gefunden, die in unbehandelten Überständen unter Umständen die Existenz eines LAF verdecken können (CALDERON & UNANUE 1975, WALDMAN & GOTTLIEB 1973). LIF ist ein Faktor mit niedrigem Molekulargewicht, der durch Dialyse von dem LAF getrennt werden kann (CALDERON & UNANUE 1975). Die Existenz eines solchen Faktors ist auch in unseren Kulturen nachweisbar: Der unbehandelte SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen zeigt eine eingipflige Dosis-Effekt Kurve sowohl in unstimulierten, als auch in mit PHA stimulierten Thymuszellkulturen (Abb. 18a, 18b). Dies kann nicht mit einer Hemmung durch Substratüberschuß erklärt werden, da die Dosis-Effekt Kurve des dialysierten SUP kein Absinken der Wirkung bei hoher Konzentration zeigt, dagegen aber ein Sättigungsplateau für maximale Stimulierung erreicht. Die inhibierenden Eigenschaften eines Ultrafiltrats des SUP von PZ-Kulturen auf die mitogene Stimulierung der DNA-Synthese von Thymuszellen (Tab. 24) und von Milzzellen (Tab. 25) beweist dann auch direkt die Existenz eines solchen dialysierbaren inhibierenden Faktors auch in unserem System. Im Gegensatz zu der Stimulierung der Produktion von LAF konnte ein Einfluß von 3',5'-cGMP auf die Bildung von LIF aber nicht nachgewiesen werden (Tab. 24).

Man nimmt an, daß die LAF-produzierenden Zellen Makrophagen sind (CALDERON & UNANUE 1975, GERY & WAKSMAN 1972). Lymphozyten können aber ebenfalls einen aktivierenden Faktor in das Kulturmedium abgeben (DISABATO et al. 1975, JACOBSON & BLOMGREN 1975). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten wir nach Entfernung der phagozytierenden Zellen aus der PZ-Population in den Überständen dieser unstimulierten PL-Kulturen ebenso wie in Überständen von Milz- und Thymuszellkulturen eine LAF-Aktivität nachweisen (Tab. 27 und 28). 3',5'-cGMP hat in diesen Kulturen jedoch keinen stimulierenden Einfluß, sondern eher eine inhibierende Wirkung auf die Abgabe dieses Faktors.

In den Überständen von PZ-Kulturen können wir deshalb die Existenz von mindestens zwei unterschiedlichen aktivierenden Faktoren, entsprechend ihrer Herkunft, unterscheiden: Der eine wird von Peritoneal-Makrophagen an das Kulturmedium abgegeben. Diese Abgabe von LAF ist von der Stimulierung durch 3',5'-cGMP abhängig. Der andere Faktor stammt aus den Peritoneal-Lymphozyten. Die Abgabe dieses Faktors ist nicht abhängig von der Stimulierung durch 3',5'-cGMP. Die LAF-Aktivität aus unstimulierten PZ-Kulturen, die in mit PHA stimulierten Thymuszell-Kulturen nachzuweisen ist, stammt somit vermutlich aus den Peritoneal-Lymphozyten. Eine spontane, von 3',5'-cGMP unab-

hängige Produktion durch Makrophagen kann allerdings mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden.

Es ist gezeigt worden, daß LPS und Lectine ebenfalls einen stimulierenden Einfluß auf die Produktion dieses Faktors durch Makrophagen haben (GERY & WAKSMAN 1972). Unter unseren Bedingungen konnte eine Wirkung von LPS oder PHA auf die LAF-Produktion nicht nachgewiesen werden (Abb. 17). Auch 2',3'-cGMP, Acetylcholin und PG F_{2α} stimulieren die Produktion von LAF nicht.

Viele biologische Aktivitäten von 3',5'-cGMP sind von Ca⁺⁺ abhängig (GOLDBERG et al. 1973). Die Stimulierung der Produktion von LAF durch 3',5'-cGMP ist dagegen unabhängig von exogenem Ca⁺⁺. Auch durch 3',5'-cAMP kann sie nicht gehemmt werden (Tab. 29). Da EGTA und 3',5'-cAMP die Proliferation hemmen, kann die LAF-Produktion also auch unter Bedingungen erfolgen, unter der die Zellen nicht mit einer erhöhten DNA-Synthese antworten können. Auch von Colchicin und Cytochalasin B konnte keine Wirkung auf die von 3',5'-cGMP abhängige LAF-Produktion nachgewiesen werden. In nichtkultivierten aufgeschlossenen PZ ist keine LAF-Aktivität nachzuweisen (Tab. 32). Demnach liegt zu Beginn der Kultur der PZ LAF noch nicht in seiner aktiven Form innerhalb der Zellen vor. Wir müssen daraus schließen, daß LAF erst während der Kulturzeit produziert oder in die aktive Form überführt wird und 3',5'-cGMP nicht nur die Abgabe eines bereits fertigen Faktors reguliert. Diese Produktion ist von einer RNA- und von einer Protein-Synthese abhängig, da sowohl Actinomycin D als auch Cycloheximid das Auftreten des von 3',5'-cGMP abhängigen LAF in PZ-Kulturen hemmen (Tab. 30). Im Gegensatz dazu scheint die von 3',5'-cGMP unabhängige LAF-Produktion in den PZ-Kulturen von der Protein-Synthese unabhängig zu sein, da Cycloheximid die LAF-Produktion der unstimulierten PZ-Kulturen nicht verändert. Die Ergebnisse über den Einfluß von Actinomycin D auf die von 3',5'-cGMP unabhängige LAF-Produktion sind widersprüchlich. Nur in zwei der durchgeführten drei Versuche wird auch diese LAF-Produktion durch Actinomycin D gehemmt.

Das Ca-Ionophore A 23187 zeigt bei der Stimulierung der DNA-Synthese von Thymuszellen und Milzzellen die selben Spezifitäten wie 3',5'-cGMP. Thymuszellen zeigen nur eine sehr schwache Antwort, während A 23187 die DNA-Synthese von Milzzellen in einer Größenordnung erhöht wie sie bei Zugabe von 3',5'-cGMP gefunden wird (Abb. 22). Diese Stimulierung der Milzzellen durch A 23187 ist abhängig von Makrophagen (Tab. 34). Sie wird vermutlich über die Stimulierung der Produktion von LAF vermittelt (Tab. 35).

Obwohl die maximale Aktivität von LAF im SUP von mit 3',5'-cGMP stimulierten PZ-Kulturen nahezu identisch ist mit der Aktivität in von A 23187 stimu-

lierten PZ-Kulturen, ist aus der Dosis-Effekt Kurve eine wesentlich stärkere Wirkung von A 23187 hinsichtlich der Produktion von LAF ersichtlich (Abb. 23). Ebenso wie die von 3',5'-cGMP abhängige LAF-Produktion wird auch die Stimulierung der Produktion durch A 23187 durch Cycloheximid und Actinomycin D gehemmt, während 3',5'-cAMP wieder wirkungslos ist (Tab. 36).

Die Stimulierung der Produktion von LAF durch das Ca-Ionophore kann nicht mit der Eigenschaft des Ionophores, Ca^{++} durch die Zellmembran zu transportieren (REED & LARDY 1972), erklärt werden: A 23187 stimuliert ebenso wie 3',5'-cGMP die Produktion von LAF auch in Abwesenheit von exogenen freien Ca-Ionen.

Da einmal der von A 23187 abhängige LAF und der von 3',5'-cGMP abhängige LAF gleiche maximale Aktivität zeigen, und zum anderen alle getesteten Bedingungen für die Produktion gleich sind, vermuten wir, daß die Stimulierung der Produktion der Faktoren über den gleichen Mechanismus erfolgt und daß beide Faktoren identisch sind.

Ca^{++} spielt bei einer Reihe von sekretorischen Systemen eine essentielle Rolle (MATTHEWS 1970, RUBIN 1970). Da 3',5'-cGMP, Acetylcholin und A 23187 die Sekretion von Lysosomalen Enzymen bei polymorphkernigen Leukozyten Ca^{++} -abhängig erhöhen (IGNARRO & GEORGE 1974, SMITH & IGNARRO 1975) wurde die These aufgestellt, daß ein erhöhter Ca^{++} -Influx die Stimulierung der Sekretion über die Aktivierung einer Ca^{++} -sensitiven Guanyl-Zyklase auslöst (SMITH & IGNARRO 1975). Ein solcher Mechanismus kann bei uns die Produktion von LAF nicht auslösen, da sie von exogenem Ca^{++} unabhängig ist. Auch ist die Produktion von LAF nicht durch 3',5'-cAMP zu hemmen, wie es für die Abgabe lysosomaler Enzyme beschrieben wird (IGNARRO & GEORGE 1974). Die Situation ist bei Makrophagen allerdings insofern anders, als Makrophagen im Gegensatz zu polymorphkernigen Leukozyten zu einer Synthese von lysosomalen Enzymen fähig sind. Aber auch hier wird eine Inhibierung der Abgabe durch 3',5'-cAMP gefunden (CRUCHAUD & WELSCHER 1975). Die Art und Weise des Mechanismus der Stimulierung kann also hier nicht so erklärt werden wie im reinen sekretorischen System. Daß exogenes 3',5'-cGMP eine Aktivierung der Produktion von LAF auslöst, könnte ein Zeichen dafür sein, daß dieser Prozess über eine von 3',5'-cGMP abhängige Protein-Kinase gesteuert wird. Wie das Ca-Ionophore an diesen Prozess ebenfalls, und zwar unabhängig von Ca^{++} , beteiligt sein kann, bleibt unklar.

Über die chemische Natur von LAF und LIF können wir aus unseren Ergebnissen keine Aussage machen. Untersuchungen von CALDERON et al. 1975 zeigen aber,

daß der aktive Bestandteil in den Überständen seiner Kulturen gegen Chymotrypsin und Pepsin empfindlich ist, von Trypsin, Papain, Carboxypeptidase A und Neuraminidase dagegen nicht angegriffen wird. LAF ist demnach ein Protein. Als Molekulargewicht fand man 15 000 bis 21 000 Daltons (CALDERON et al. 1975) bzw. 5 000 bis 25 000 Daltons (GERY & HANDSCHUHMACHER 1974). Wegen des weiten Bereiches der Molekülgröße wird vermutet, daß LAF keine einheitliche Fraktion ist (GERY & HANDSCHUHMACHER 1974).

Der inhibierende Bestandteil der Überstände von Makrophagenkulturen ist dialysierbar und hat ein Molekulargewicht von unter 1000 (CALDERON et al. 1974). Man hat aus dem SUP von Makrophagenkulturen Thymidin als einen inhibierenden Faktor des (³H)TdR-Einbaus identifiziert (OPITZ et al. 1975). Untersuchungen von anderen (CALDERON et al. 1974) und unsere eigenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß der inhibierende Faktor nicht nur die (³H)TdR-Einbaurate, sondern auch die Proliferation der Zellen hemmt.

Über die Rolle von LAF und LIF in vivo liegen keine Untersuchungen vor. Die Untersuchungen anderer Autoren und unsere eigenen zeigen, daß LIF in vitro ein Hemmer der mitogenen Stimulierung von Lymphozyten ist (CALDERON et al. 1974, KELLER 1975, YOSHINAGA et al. 1975) und ebenfalls die Proliferation von leukämischen EL-4 Zellen und 3T3 Zellen hemmt (CALDERON et al. 1974). LAF aktiviert in vitro Lymphozyten, erhöht die Antwort von Lymphozyten auf B- und T-Zell-Mitogene (CALDERON & UNANUE 1975, GERY et al. 1972, KELLER 1975, YOSHINAGA et al. 1975), und erhöht die Immunantwort (CALDERON et al. 1975, WOOD & CAMERON 1975). Wir nehmen deshalb an, daß die Produktion und Abgabe dieser Faktoren durch Makrophagen in vivo in der Regulation der immunologischen Abwehr ihre biologische Bedeutung hat.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. EGTA hemmt die mitogene Stimulierung der DNA-Synthese durch T und B-Zell-Mitogene in Milzzellen der Maus in vitro.

2. In der Aktivierungsphase der Lymphozyten wurden von Ca^{++} abhängige bzw. von Ca^{++} unabhängige Abschnitte festgestellt:

Bis zu 12 h nach mitogener Stimulierung scheint die Aktivierung von Lymphozyten von exogenem Ca^{++} unabhängig zu sein. Auf diese frühe Phase folgt dann eine von Ca^{++} abhängige Phase. Die DNA-Synthese selbst ist dann wieder von exogenem Ca^{++} unabhängig. Die Unabhängigkeit der mitogenen Stimulierung von exogenem Ca^{++} während der frühen Aktivierungsphase spricht gegen eine Rolle von Ca^{++} als 'second messenger' bei dieser Stimulierung.

3. Das Ca-Ionophore A 23187 stimuliert die DNA-Synthese in Milzzellkulturen der Maus. Es übt seine Wirkung auf die Aktivierung der Lymphozyten jedoch nicht direkt aus. Die Stimulierung ist von der Anwesenheit von Helferzellen, vermutlich Makrophagen, abhängig, und wird zumindest zum Teil durch einen löslichen Faktor (LAF) aus diesen Makrophagen vermittelt. Eine Stimulierung der DNA-Synthese von Lymphozyten durch A 23187 kann somit nicht als ein Argument dafür herangezogen werden, daß Ca^{++} nach einem erhöhten Ca^{++} -Influx nach mitogener Stimulierung die intrazellulären Reaktionen bei der Aktivierung der Lymphozyten auslöst.

4. 3',5'-cGMP, 2',3'-cGMP und GDP stimulieren die DNA-Synthese in Lymphozyten der Maus. Alle anderen getesteten zyklischen und nicht-zyklischen Nukleotide zeigen keinen oder einen inhibierenden Effekt. Auch Substanzen, die physiologisch die intrazelluläre Konzentration von zyklischen Nukleotiden verändern können, zeigten ebenfalls nur hemmende Effekte auf die Aktivierung der Lymphozyten.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, daß 2',3'-cGMP die DNA-Synthese von B-Lymphozyten stimuliert, 3',5'-cGMP und GDP aktivieren dagegen anscheinend eher T-Lymphozyten. Diese Stimulierung der T-Zellen ist jedoch abhängig von der Beteiligung von Helferzellen. Diese Helferzellen sind vermutlich die Makrophagen. Sie können durch 3',5'-cGMP und GDP zur Produktion eines löslichen, die Lymphozyten aktivierenden Faktors (LAF) angeregt werden, der dann für die Stimulierung der DNA-Synthese in Lymphozytenkulturen durch 3',5'-cGMP und GDP verantwortlich gemacht werden kann. Eine Stimulierung von B-Lymphozyten durch 3',5'-cGMP und GDP kann durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5. 3',5'-cGMP und GDP, aber nicht 2',3'-cGMP heben die durch 3',5'-cAMP verursachte Hemmung der mitogenen Antwort von B- und T-Lymphozyten zumindest teilweise wieder auf. Diese antagonistische Wirkung kann jedoch nicht durch die Produktion von LAF erklärt werden, da LAF keine Wirkung auf die mitogene Antwort nach einer Hemmung mit 3',5'-cAMP hat. Da eine direkte Aktivierung von T- und von B-Lymphozyten durch 3',5'-cGMP nicht nachgewiesen werden konnte, können unsere Ergebnisse die Vermutung nicht unterstützen, daß 3',5'-cGMP ein 'second messenger' der mitogenen Stimulierung sei. Wir meinen jedoch, daß 3',5'-cGMP und 3',5'-cAMP einen antagonistischen Einfluß bei der Regulierung der mitogenen Antwort von T- und B-Lymphozyten haben.

6. 3',5'-cGMP, GDP und das Ca-Ionophore A 23187 regen in PZ-Kulturen der Maus die Produktion von löslichen, die Lymphozyten aktivierenden Faktor(en) (LAF) an. LAF stimuliert die DNA-Synthese und Proliferation von Lymphozyten und erhöht synergistisch die mitogene Antwort von Thymuszellen. In den Überständen von Kulturen aus Peritoneal-Lymphozyten, Thymuszellen und Milzzellen ist ebenfalls eine LAF-Aktivität festzustellen. Im Gegensatz zu der Produktion von LAF in PZ-Kulturen hat 3',5'-cGMP keinen stimulierenden Einfluß auf die Produktion dieses Faktors durch Lymphozyten. Wir können deshalb in den Überständen von PZ-Kulturen zwei verschiedene LAF annehmen: Der eine stammt aus den Peritoneal-Makrophagen. Die Produktion dieses Faktors kann durch 3',5'-cGMP angeregt werden. Der andere LAF stammt von den Peritoneal-Lymphozyten. Die Produktion dieses Faktors kann durch 3',5'-cGMP nicht stimuliert werden.

7. Die Stimulierung der Produktion von LAF in Makrophagen durch 3',5'-cGMP und A 23187 ist von exogenem Ca^{++} unabhängig und kann durch 3',5'-cAMP nicht unterdrückt werden. Cycloheximid und Actinomycin D hemmen beide die Produktion dieses von Makrophagen stammenden LAF. Cycloheximid hat aber keinen Einfluß auf die Produktion des von Lymphozyten stammenden LAF.

8. Neben dem nicht dialysierbaren LAF konnten wir in den Überständen von PZ Kulturen einen dialysierbaren, die Aktivierung von Lymphozyten inhibierenden Faktor (LIF) nachweisen. Dieser Faktor hemmt die mitogene Stimulierung der DNA-Synthese und die Proliferation von Lymphozyten. Die Produktion und/oder Freisetzung von LIF kann nicht durch 3',5'-cGMP erhöht werden.

Über die Hemmung bzw. Aktivierung der Stimulierung von Lymphozyten können LIF und LAF möglicherweise an der Regulierung der Immunantwort in vivo eine Rolle spielen.

6. ABKÜRZUNGEN

AR	: Adenosin
AMP	: Adenosin-5'-Monophosphat
ADP	: Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	: Adenosin-5'-Triphosphat
2',3'-cAMP	: zyklisches Adenosin-2',3'-Monophosphat
3',5'-cAMP	: zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
db-cAMP	: N6-2'-O-Dibutyryl 3',5'-cAMP
8Br-cAMP	: 8-Brom 3',5'-cAMP
GR	: Guanosin
GMP	: Guanosin-5'-Monophosphat
GDP	: Guanosin-5'-Diphosphat
GTP	: Guanosin-5'-Triphosphat
2',3'-cGMP	: zyklisches Guanosin-2',3'-Monophosphat
3',5'-cGMP	: zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
db-cGMP	: N6-2'-O-Dibutyryl 3',5'-cGMP
8Br-cGMP	: 8-Brom 3',5'-cGMP
cCMP	: zyklisches Cytidin-3',5'-Monophosphat
cIMP	: zyklisches Inosin-3',5'-Monophosphat
mb-cIMP	: N6-Monobutyryl cIMP
c-dTMP	: zyklisches Desoxythymidin-3',5'-Monophosphat
cUMP	: zyklisches Uridin-3',5'-Monophosphat
B-Lymphozyten	: Bursa- (oder Bursa Äquivalent) abhängige Lymphozyten
Con A	: Concanavalin A
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DS	: Dextransulfat
EGTA	: Äthylenglycol-bis-(2-Aminoethyläther)-N,N'-tetra-Essigsäure
FKS	: foetales Kälberserum
HS	: Humanserum
Ipm	: Impulse pro Minute
LAF	: Lymphozyten-aktivierender Faktor
LIF	: Lymphozyten-inhibierender Faktor
LPS	: Lipopolysaccharid von E.coli 055:B5
LSR	: Lymphozyte-separating reagent
PG E ₂	: Prostaglandin in E ₂
PG F _{2α}	: Prostaglandin F _{2α}
PHA	: Phytohaemagglutinin
PL	: Peritoneal-Lymphozyten
POPOP	: 2,2'-p-Phenyl-bis-(5-Phenylloxazol)
PPO	: 2,5 Diphenylloxazol
PR	: Potentierungs-Rate
PWM	: Pokeweed Mitogen
PZ	: Peritoneal-Zellen
sam	: Standardabweichung des Mittelwertes
SRBC	: Schafs-Erythrozyten (sheep red blood cells)
StR	: Stimulations-Rate
SUP	: Überstand (supernatant)
TCA	: Trichloressigsäure
(³ H)TdR	: (³ H)-Thymidin
T-Lymphozyten	: Thymus-abhängige Lymphozyten

7. LITERATURVERZEICHNIS

- AHERN, T. & KAY, J.E. (1975): Protein synthesis and ribosome activation during the early stages of phytohemagglutinin lymphocyte stimulation. *Exp.Cell Res.* 92, 513.
- ALFORD, R.H. (1970): Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation in human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 104, 698.
- ALLFREY, V.C. (1970): Changes in chromosomal proteins at times of gene activation. *Fed.Proc.* 29, 1447.
- ALLWOOD, G., ASHERSON, G.L., DAVEY, M.J. & GOODFORD, P.J. (1971): The early uptake of radioactive calcium by human lymphocytes treated with phytohemagglutinin. *Immunology* 21, 509.
- ANDERSON, J., EDELMAN, G.M., MÖLLER, G. & SJÖBERG, O. (1972): Activation of B lymphocytes by locally concentrated concanavalin A. *Europ. J. Immunol.* 2, 233.
- AVERDUNK, R. & LAUF, P.K. (1975): Effects of mitogens on sodium-potassium transport, ³H-Ouabain binding, and adenosine triphosphatase activity in lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 93, 331.
- BARLOW, S.D. & ORD, M.G. (1975): Thymidine transport in phytohemagglutinin-stimulated pig lymphocytes. *Biochem. J.* 148, 295.
- BARNETT, R.E., SCOTT, R.E., FURCHT, L.T. & KERSEY, J.H. (1974): Evidence that mitogenic lectins induce changes in lymphocyte membrane fluidity. *Nature* 249, 465.
- BETEL, I. & VAN DEN BERG, K.J. (1974): The relationship between "early events" and DNA synthesis in mitogen stimulated lymphocytes. *Proc.Ninth Leucoc. Cult. Conf., Immune Recognition*, Academic Press, New York, p. 505.
- BLOXHAM, D.P. & AKHTAR, M. (1972): An anti-anabolic role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the control of liver metabolism. A hypothetical mechanism for gluconeogenesis. *Int. J. Biochem.* 3, 294.

- BOMBIK, B.M. & BURGER, M.M. (1973): c-AMP and the cell cycle: Inhibition of growth stimulation. *Exp. Cell Res.* 80, 88.
- BÖSING - SCHNEIDER, R. & KÖLB, H. (1973): Influence of cyclic AMP on early events of the immune response. *Nature* 244, 224.
- BÖSING - SCHNEIDER, R. (1975): Differential effects of cyclic AMP on the in vitro induction of antibody synthesis. *Nature* 256, 137.
- BRAUN, W. & ISHIZUKA, M. (1971): Cyclic AMP and immune response. II. Phosphodiesterase inhibitors as potentiators of polynucleotide effects on antibody formation. *J. Immunol.* 107, 1036.
- BURGER, M.M., BOMBIK, B.M., BRECKENRIDGE, B.M. & SHEPPARD, J.R. (1972): Growth control and cyclic alterations of cyclic AMP in the cell cycle. *Nature New Biol.* 239, 161.
- BURNET, F.M. (1959): The clonal selection theory of acquired immunity. Vanderbilt University Press, Nashville, Tennessee USA.
- BYRON, J.W. (1972): Evidence for a β -adrenergic receptor initiating DNA-synthesis in hemopoietic stem cells. *Exp. Cell Res.* 71, 228.
- CALDERON, J., KIELY, J.A., LEFKO, J.L. & UNANUE, E.R. (1975): The modulation of lymphocyte function by molecules secreted by macrophages. *J. Exp. Med.* 142, 151.
- CALDERON, J. & UNANUE, E.R. (1975): Two biological activities regulating cell proliferation found in cultures of peritoneal exudate cells. *Nature*, 253, 359.
- CALDERON, J., WILLIAMS, R.T. & UNANUE, E.R. (1974): An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4273.
- CALDWELL, P.C. (1970): Calcium chelation and buffers. In: Calcium and cellular function (Ed.: A.W. Cuthbert) Macmillan, London, p. 10.
- CLARK, R.B. & GROSS, R. (1974): Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate content in human astrocytoma cells by adenosine and the adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 249, 5296.

CRUCHAUD, A. & WELSCHER, H.D. (1975): Correlations between phagocytosis, lysosomal enzyme release and cellular cAMP in mouse macrophages. 10th Leucocyte Culture Conference, Abstract I, p. 27.

DARZYNKIEWICZ, Z., BOLUND, L. & RINGERTZ, N.R. (1969): Nucleoprotein changes and initiation of RNA synthesis in PHA stimulated lymphocytes. Exp. Cell. Res. 56 418.

DERUBERTIS, F.R., ZENSER, T.V., ADLER, W.H. & HUDSON, T. (1974): Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in lymphocyte mitogenesis. J. Immunol. 113, 151.

DIAMANTSTEIN, T., BLITSTEIN-WILLINGER, E. & SCHULZ, G. (1974): Polyanions and lipopolysaccharide acts on different subpopulations of B cells. Nature 250, 596.

DIAMANTSTEIN, T. & ODENWALD, M.V. (1974): Control of the immune response in vitro by calcium ions. I. The antagonistic action of calcium ions on cell proliferation and on cell differentiation. Immunology 27, 531.

DISABATO, G., CHEN, D.-M. & ERICKSON, J.W. (1975): Production by murine spleen cells of an activity stimulating the PHA-responsiveness of thymus lymphocytes. Cell. Immunol. 17, 495.

EDELMAN, G.M., YAHARA, I. & WANG, J.L. (1973): Receptor mobility and receptor-cytoplasmic interactions in lymphocytes Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1442.

FISHER, D.B. & MUELLER, G.C. (1969): The stepwise acceleration of phosphatidyl choline synthesis in phytohemagglutinin-treated lymphocytes. Biochim. Biophys. Acta 176, 316.

FREEDMAN, M.H., RAFF, M.C. & GOMBERTS, B. (1975): Induction of increased calcium uptake in mouse T lymphocytes by concanavalin A and its modulation by cyclic nucleotides. Nature 255, 378.

GALLO, R.C. & WHANG-PENG, J. (1971): Enhanced transformation of human immunocompetent cells by dibutyryl adenosine cyclic 3',5'-monophosphate. J.Nat. Cancer Inst. 47, 91.

GERY, I., GERSHON, R.K. & WAKSMAN, B.H. (1972): Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. J. Exp. Med. 136, 128.

GERY, I. & HANDSCHUHMACHER, R.E. (1974): Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. III. Properties of the mediator(s) from adherent cells. *Coll. Immunol.* 11, 162.

GERY, I. & WAKSMAN, B.H. (1972): Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J. Exp. Med.* 136, 143.

GILLESPIE, E. (1974): Cyclic AMP and microtubules. In: Cyclic AMP, cell growth, and the immune response (Ed.: W. Braun, L.M. Lichtenstein & C.W. Parker) Springer Verlag, New York, p. 317.

GILLETTE, R.W., MCKENZIE, G.O. & SWANSON, M.H. (1974): Modification of the lymphocyte response to mitogens by cyclic AMP and GMP. *J. Reticuloendoth. Soc.* 16, 289.

GILMAN, A.G. (1970): A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 305.

GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., ESTENSEN, R., WHITE, J.G., LOPEZ, C. & HADDEN, J.W. (1974): Evidence of a dualism between cyclic GMP and cyclic AMP in the regulation of cell proliferation and other cellular processes. In: Cyclic AMP, cell growth, and the immune response (Ed.: W. Braun, L. M. Lichtenstein & C.W. Parker) Springer Verlag, New York, p. 247.

GOLDBERG, N.D., O'DEA, R.F. & HADDOX, M.K. (1973): Cyclic GMP. In: Advances in cyclic nucleotide Res. (Ed.: P. Greengard & G.A. Robinson) Raven Press, New York, Vol. 3, p. 155.

GOLDFINE, J.D., ROTH, J. & BIRNBAUMER, L. (1974): Glucagon receptors in β -cells. *J. Biol. Chem.* 247, 1211.

GREAVES, M.F. & BAUMINGER, S. (1972): Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens. *Nature New Biol.* 235, 67.

GREAVES, M.F., BAUMINGER, S. & JANOSSY, G. (1972): Lymphocyte activation. III. Binding sites for phytomitogens on lymphocyte subpopulations. *Clin. Exp. Immunol.* 10, 537.

GREENE, W.C., WEDNER, H.J. & PARKER, C.W. (1975): Calcium ionophore A 23187 and lymphocyte activation. 10th Leucocyte Culture Conference, Abstract I, p. 60.

GRONOWICZ, E. COUTINHO, A. & MÖLLER, G. (1974): Differentiation of B cells. Sequential appearance of responsiveness to polyclonal activators. *Scand. J. Immunol.* 3, 413.

GUNTHER, G.R., WANG, J.L. & EDELMANN, G.M. (1974): The kinetics of cellular commitment during stimulation of lymphocytes by lectins. *J. Cell. Biol.* 62, 366.

GUNTHER, G.R., WANG, J. L., YAHARA, I., CUNNINGHAM, B.A. & EDELMANN, G.M. (1973): Concanavalin A derivatives with altered biological activities. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1012.

HADDEN, J.W., HADDEN, E.M. & GOLDBERG, N.D. (1974): Cyclic GMP and cyclic AMP in lymphocyte metabolism and proliferation. In: *Cyclic AMP, cell growth, and the immune response* (Ed.: W. Braun, L.M. Lichtenstein & C.W. Parker) Springer Verlag, New York, p. 237.

HADDEN, J.W., HADDEN, E.M. HADDOX, M.K. & GOLDBERG, N.D. (1972): Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 3024.

HADDEN, J.W., HADDEN, E.M. & MIDDLETON, E. (1970): Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. *Cell. Immunol.* 1, 583.

HARTZMAN, R.J., BACH, M.L., BACH, F.H. THURMAN, G.B. & SELL, K.W. (1972): Precipitation of radioactively labeled samples. A semiautomatic multiple-sample processor. *Cell. Immunol.* 4, 182.

HARWOOD, J.P., LÖW, H. & RODBELL, M. (1973): Stimulatory and inhibitory effects of guanyl nucleotides on fat cell adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 248, 6239.

HEILBRUNN, L.V. & WIERCINSKI, F.J. (1947): The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.* 29, 15.

HEMINSKI, K. (1975): Synthesis of chromatin proteins in resting and stimulated human lymphocyte populations. *Exp. Cell Res.* 93, 63.

HIRSCHHORN, R., GROSSMAN, J. & WEISSMANN, G. (1970): Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and theophylline on lymphocyte transformation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133, 1361.

HIRSCHHORN, K. & HIRSCHHORN, R. (1974): Mechanism of lymphocyte activation. In: Mechanism of cell-mediated immunity (Ed.: R.T. McCluskey & S. Cohen) J. Wiley & Sons, New York, p. 115.

HOVI, T., WILLIAMS, S.C. & ALLISON, A.C. (1975): Divalent cation ionophore A 23187 forms lipid soluble complexes with leucine and other amino acids. Nature 256, 70.

HUNGERFORD, D.A., DONALLY, A.J., NOWELL, P.C. & BECK, S. (1959): The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. Amer. J. Hum. Genet. 11, 215.

IGNARRO, L.J. & GEORGE, W.J. (1974): Mediation of immunologic discharge of lysosomal enzymes from human neutrophils by guanosine 3',5'-monophosphate. Requirement of calcium, and inhibition by adenosine 3',5'-monophosphate. J. Exp. Med. 140, 225.

JACOBSSON, H. & BLOMGREN, H. (1975): Characterization of mouse cells releasing or responding to mitogenic factor induced by phytomitogens in vitro. J. Immunol. 114, 1631.

JOHNSON, E.M. & HADDEN, J.W. (1975): Phosphorylation of lymphocyte nuclear acidic proteins. Regulation by cyclic nucleotides. Science 187, 1198.

JOHNSON, E.M., KARN, J. & ALLFREY, V.G. (1974): Early nuclear events in the induction of lymphocyte proliferation by mitogens. J. Biol. Chem. 249, 4990.

JULIUS, M.H., SIMPSON, E. & HERZENBERG, L.A. (1973): A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Europ. J. Immunol. 3, 645.

KALINER, M. & AUSTEN, K. F. (1973): Adenosine 3',5'-monophosphate. Inhibition of complement-mediated cytolysis. Science 183, 659.

KAY, J.E. (1971): Interaction of lymphocytes and phytohemagglutinin. Inhibition by chelating agents. Exp. Cell Res. 68, 11.

KELLER, R. (1975): Major changes in lymphocyte proliferation evoked by activated macrophages. Cell. Immunol. 17, 542.

KISH, V.M. & KLEINSMITH, L.J. (1974): Nuclear protein kinases. Evidence for their heterogeneity, tissue specificity, substrate specificities, and differential responses to cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 249, 750.

- KLEINSMITH, L.J., ALLFREY, V.G. & MIRSKY, A.E. (1966): Phosphorylation of nuclear protein early in the course of gene activation in lymphocytes. *Science* 154, 780.
- KLOTZ, U. & STOCK, K. (1972): Influence of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate on the enzymatic hydrolysis of adenosine 3',5'-monophosphate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 274, 54.
- KRISHNARAJ, R. & TALWAR, G.P. (1973): Role of cyclic AMP in mitogen induced transformation of human peripheral leukocytes. *J. Immunol.* 111, 1010.
- KUEHL, F.A. (1974): Prostaglandins, cyclic nucleotides and cell function. *Prostaglandins* 5, 325.
- KUO, J.F. (1974): Guanosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases in mammalian tissues. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4037.
- KURTZ, M.J., POLGAR, P., TAYLOR, L. & RUTENBURG, A.M. (1974): The role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the division of WI 38 cells. *Biochem. J.* 142, 339.
- LICHTENSTEIN, B., PASELTINER, L. & WELDON, W.: The technicon lymphocyte separator. A new tool for the immunologist. *Technicon Bulletin*.
- LINDAHL-KIESLING, K. & MATTSON, A. (1971): Mechanism of phytohemagglutine (PHA) action. IV. Effect of some metabolic inhibitors on binding of PHA to lymphocytes and the stimulatory potential of PHA-treated cells. *Exp. Cell Res.* 65, 307.
- LUCAS, D.O., SHOHET, S.B. & MERLER, E. (1971): Changes in phospholipid metabolism which occur as a consequence of mitogenic stimulation of lymphocytes. *J. Immunol.* 106, 768.
- LUCKASEN, J.R., WHITE, J.G. & KERSEY, J.H. (1974): Mitogenic properties of a calcium ionophore A 23187. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 5088.
- MACMANUS, J.P., BOYNTON, A.L., WHITFIELD, J.E., GILLAN, D.J. & ISAACS, R.J. (1975): Acetylcholine-induced initiation of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation. *J. Cell. Physiol.* 85, 321.

- MACMANUS, J.P. & WHITFIELD, J.F. (1969): Stimulation of DNA synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Exp. Cell Res.* 58, 188.
- MACMANUS, J.P. & WHITFIELD, J.F. (1972): Cyclic-AMP binding sites on the cell surface of thymic lymphocytes. *Life Sciences* 11, 837.
- MAINO, V.C., GREEN, N.M. & CRUMPTON, M.J. (1974): The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. *Nature* 251, 324.
- MAINO, V.C. HAYMAN, M.J. & CRUMPTON, M.J. (1975): Relationship between enhanced turnover of phosphatidylinositol and lymphocyte activation by mitogens. *Biochem. J.* 146, 247.
- MASUZAWA, Y., OSAWA, T., INOUE, K. & NOJIMA, S. (1973): Effects of various mitogens on the phospholipid metabolism of human peripheral lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 326, 339.
- MATTHEWS, E.K. (1970): Calcium and hormone release. In: Calcium and cellular function (Ed.: A.W. Cuthbert) Macmillan & Co Ltd., London, p. 163.
- MCCRERY, J.E. & RIGBY, P.G. (1971): A comparison of human lymphocyte stimulation by cyclic AMP, GMP, and related compounds. *J. Lab. Clin. Med.* 78, 856.
- MELCHERS, F. & ANDERSON, J. (1973): Synthesis, surface deposition, and secretion of immunoglobulin M in bone marrow-derived lymphocyte before and after mitogenic stimulation. *Transplant. Rev.* 14, 76.
- MANDELSON, J., MULTER, M. M. & BOONE, R.F. (1973): Enhanced effects of prostaglandin E_1 and dibutyryl cyclic AMP upon human lymphocytes in presence of cortisol. *J. Clin. Invest.* 52, 2129.
- MENDELSON, J., SKINNER, A. & KORNFELD, S. (1971): The rapid induction by phytohemagglutinin of increased α -aminoisobutyric acid uptake by lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 50, 818.
- MORLEY, C.G.D. & KINGDON, H.S. (1972): Use of ^3H -thymidine for measurement of DNA synthesis in rat liver - a warning. *Analytical Biochem.* 45, 298.
- MOSIER, D.E. (1967): A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* 158, 1573.

NEELY, A.N., SABAD, A. & KERSEY, J.H. (1975): A mitogenic ionophore A 23187 enhances calcium uptake in human lymphocytes. *Fed. Proc.* 34, 951.

NOVOGRODSKY, A. & KATCHALSKI, E. (1970): Effect of phytohemagglutinin and prostaglandins on cyclic AMP synthesis in rat lymph node lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 215, 291.

NOWELL, P.C. (1960): Phytohemagglutinin. An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462.

OLIVER, J.M. (1975): Microtubules, cyclic GMP, and control of cell surface topography. *Immune recognition*, Academic Press, New York, p. 445.

OLSEN, I. & HARRIS, G. (1975): Thymidine kinase of mouse spleen cells in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 146, 489.

OPITZ, H.G., NIETHAMMER, D., JACKSON, R.C., LEMKE, H., HUGET, R. & FLAD, H.-D. (1975): Biochemical characterization of a factor released by macrophages. *Cell. Immunol.* 18, 70.

OTTEN, J., JOHNSON, G.S. & PASTAN, I. (1972): Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 247, 7082.

PETERS, J.H. & HAUSEN, P. (1971 a): Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. I. Stimulation of uridine uptake. *Europ. J. Biochem.* 19, 502.

PETERS, J.H. & HAUSEN, P. (1971 b): Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. II. Stimulation of "facilitated diffusion" of 3-O-methyl-glucose. *Europ. J. Biochem.* 19, 509.

POMMIER, G., RIPERT, G., AZOULAY, E. & DEPIEDS, R. (1975): Effect of concanavalin A on membrane-bound enzymes from mouse lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 389, 483.

POGO, B.G.T., ALLFREY, V.G. & MIRSKY, A.E. (1966): RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 55, 805.

QUASTEL, M.R. & KAPLAN, J.G. (1970): Early stimulation of potassium uptake in lymphocytes treated with PHA. *Exp. Cell. Res.* 63, 230.

- RABINOWITZ, Y. (1964): Separation of lymphocytes, polymorphnuclear leukocytes, and monocytes on glass columns, including tissue culture observations. *Blood* 23, 811.
- REED, P.W. & LARDY, H.A. (1972): A 23187: A divalent cation ionophore. *J. Biol. Chem.* 247, 6970.
- RESCH, K. (im Druck): Membrane associated events in lymphocyte activation. In: Receptor and recognition (Ed.: P. Cuatrecasas & M.F. Greaves) Chapmes and Hall, London.
- RESCH, K. (1975): The induction of lymphocyte activation by a divalent cation ionophore. *Zeitsch. f. Immunitätsforsch.* 150, 228.
- RESCH, K., PRESTER, M. & FERBER, E. (1975): The role of divalent cations in the initiation of lymphocyte activation. 10th Leucocyte Culture Conference, Abstract I, p. 123.
- RIKANS, L.E. & RUDDON, R.W. (1973): Role of 3',5'-cyclic AMP in the control of nuclear protein kinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54, 387.
- ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. & SUTHERLAND, E.W. (1971): Cyclic AMP. Academic Press, New York.
- ROELOFSEN, B. & DEENEN, L.L.M. (1973): Lipid requirement of membrane-bound ATP'ase. *Europ. J. Biochem.* 40, 245.
- ROOS, D. & LOOS, J.A. (1970): Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 222, 565.
- ROSENBERG, S.A. & LEVY, R. (1972): A rapid assay of cell mediated immunity to soluble antigens based on the stimulation of protein synthesis. *J. Immunol.* 108, 1080.
- RUBIN, R.P. (1970): The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.* 22, 389.
- RUDLAND, P.S., SEELEY, M. & SEIFERT, W. (1974): Cyclic GMP and cyclic AMP levels in normal and transformed fibroblasts. *Nature* 251, 417.

SELLERS, A., BLOXHAM, D.P., MUNDAY, K.A. & AKHTAR, M. (1974): Anti-anabolic effects of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. Inhibition of protein synthesis. *Biochem. J.* 138, 335.

SHEPPARD, J.R. (1974): The role of cyclic AMP in the control of cell division. In: *Cyclic AMP, cell growth and the immune response* (Ed.: W. Braun, L.M. Lichtenstein & C.W. Parker) Springer Verlag, New York, p. 290.

SHORTMAN, K., WILLIAMS, N., JACKSON, H., RUSSEL, P., BYRT, P. & DIENER, E. (1971): The separation of different cell classes from lymphoid organs. IV. The separation of lymphocytes from phagocytes on glass bead columns, and its effect on subpopulations of lymphocytes and antibody-forming cells. *J. Cell Biol.* 48, 566.

SMITH, J.W., STEINER, A.L. & PARKER, C.W. (1970): Early effect of PHA on lymphocyte c-AMP levels. *Fed. Proc.* 29, Abstract 369.

SMITH, J.W., STEINER, A.L., NEWBERRY, W.M. & PARKER, C.W. (1971 a): Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in human lymphocytes. Alteration after phytohemagglutinin stimulation. *J. Clin. Invest.* 50, 432.

SMITH, J.W., STEINER, A.L. & PARKER, C.W. (1971 b): Human lymphocyte metabolism. Effect of cyclic and noncyclic nucleotides on stimulation of phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.* 50, 442.

SMITH, R.J. & IGNARRO, L.J. (1975): Bioregulation of lysosomal enzyme secretion from human neutrophils. Role of guanosine 3',5'-monophosphate and calcium in stimulus-secretion coupling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 108.

STOBO, J.D. & PAUL, W.E. (1973): Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and concanavalin A as a probe for T cell subsets. *J. Immunol.* 110, 362.

STOBO, J.D., ROSENTHAL, A.S. & PAUL, W.E. (1972): Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. I. Responsiveness to and surface binding of concanavalin A and phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 108, 1.

UNANUE, E.R., PERKINS, W.D. & KARNOVSKY, M.J. (1972): Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence and ultrastructural radioautography. *J. Exp. Med.* 136, 885.

VAN DEN BERG, K.J. & BETEL, I. (1973): Increased transport of 2-aminoisobutyric acid in rat lymphocytes stimulated with concanavalin A. *Exp. Cell Res.* 76, 63.

WALDMAN, S.R. & GOTTLIEB (1973): Macrophage regulation of DNA synthesis in lymphoid cells. Effect of a soluble factor from macrophages. *Cell. Immunol.* 9, 142.

WATSON, J. (1975): The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis. *J. Exp. Med.* 141, 97.

WATSON, J., EPSTEIN, R. & COHN, M. (1973): Cyclic nucleotides as intracellular mediators of the expression of antigen-sensitive cells. *Nature* 246, 405.

WEINSTEIN, Y., CHAMBERS, D.A., BOURNE, H.R. & MELMON, K.L. (1974): Cyclic GMP stimulates lymphocyte nucleic acid synthesis. *Nature* 251, 352.

WEINSTEIN, Y., SEGAL, S. & MELMON, K.L. (1975): Specific mitogenic activity of 8-Br-guanosine 3',5'-monophosphate (Br-cyclic GMP) on B lymphocytes. *J. Immunol.* 115, 112.

WHITFIELD, J.F., MACMANUS, J.P., FRANKS, D.J., GILLAN, D.J. & YOUNDALE, T. (1971): The possible mediation by cyclic AMP of the stimulation of thymocyte proliferation by cyclic GMP. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137, 453.

WHITFIELD, J.F., MACMANUS, J.P., BOYNTON, A.L., GILLAN, D.J. & ISAACS, R.J. (1974): Concanavalin A and the initiation of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation by a calcium dependent increase in cyclic GMP level. *J. Cell. Physiol.* 84, 445.

WHITFIELD, J.F., RIXON, R.H., MACMANUS, J.P. & BULK, S.D. (1973): Calcium, cyclic AMP and the control of cell proliferation - a review. *In Vitro* 8, 257.

WHITNEY, R.B. & SUTHERLAND, R.M. (1972 a): Requirement for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. *J. Cell. Physiol.* 80, 329.

WHITNEY, R.B. & SUTHERLAND, R.M. (1972 b): Enhanced uptake of calcium by transforming lymphocytes. *Cell. Immunol.* 5, 137.

WHITNEY, R.B. & SUTHERLAND, R.M. (1973 a): Effects of chelatin agents on the initial interaction of phytohemagglutinin with lymphocytes and the subsequent stimulation of amino acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 790.

- WHITNEY, R.B. & SUTHERLAND, R.M. (1973 b): Characteristics of calcium accumulation by lymphocytes and alterations in the process induced by phyto-hemagglutinin. *J. Cell. Physiol.* 82, 9.
- WILLINGHAM, M.C. & PASTAN, I. (1975): Cyclic AMP and cell morphology in cultured fibroblasts. Effects on cell shape, microfilament and microtubule distribution, and orientation to substratum. *J. Cell Biol.* 67, 146.
- WINCHURCH, R., ISHIZUKA, M., WEBB, D.R. & BRAUN, W. (1971): Adenyl cyclase activity of spleen cells exposed to immunoenhancing synthetic oligo- and polynucleotides. *J. Immunol.* 106, 1399.
- WOLBERG, W.H. (1971): Alternativ pathways for DNA-thymidine synthesis in stimulated leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 8, 177.
- WOLFF, J. & COOK, G.H. (1973): Activation of thyroid membrane adenylate cyclase by purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 248, 350.
- WOOD, D.D. & CAMERON, P.M. (1975): Studies on the mechanism of stimulation of the humoral response of murine spleen cultures by culture fluids from human monocytes. *J. Immunol.* 114, 1094.
- WRAGG, J.B., CARR, J.V. & ROSS, V.C. (1967): Inhibition of DNA polymerase activity by caffeine in a mammalian cell line. *J. Cell Biol.* 35, 146A.
- YAHARA, I. & EDELMAN, G.M. (1972): Restriction of the mobility of lymphocyte immunoglobulin receptors by concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 608.
- YAHARA, I. & EDELMAN, G.M. (1973): The effect of concanavalin A on the mobility of lymphocyte receptors. *Exp. Cell Res.* 81, 143.
- YAMAMOTO, I. & WEBB, D.R. (1975): Antigen-stimulated changes in cyclic nucleotide levels in the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 2320.
- YOSHINAGA, M., NAKAMURA, S. & HAYASHI, H. (1975): Interaction between lymphocytes and inflammatory exudate cells. I. Enhancement of thymocyte response to PHA by product(s) of polymorphonuclear leucocytes and macrophages. *J. Immunol.* 115, 533.

8. LEBENSLAUF

geboren am : 22. September 1944
in : Lüneburg

Schulen : 1950 - 1953 Volksschule in Predöhl (Kreis
Lüchow-Dannenberg)
1953 - 1955 Volksschule in Lüneburg
1955 - 1957 Johanneum in Lüneburg
1957 - 1966 Herder-Schule in Lüneburg

Studium : SS 1966 Mathematik an der FU Berlin
seit WS 1966/67 Biologie an der FU Berlin

Examina : 4. 2. 1966 Abitur an der Herder-Schule in
Lüneburg
24. 4. 1969 Vorprüfung zur Diplomprüfung in Biologie
19. 6. 1973 Diplomprüfung in Biologie in den Fächern
Zoologie, Biochemie und Physik. Thema
der Diplomarbeit: "Resorption von Nahrungs-
triglyceriden und deren Einbau in die
Lipidfraktionen in der Mitteldarmdrüse
des Flußkrebses *Orconectes limosus*". Die
Diplomarbeit wurde unter der Anleitung
von Prof. Dr. K. Graszynski am Institut
für Tierphysiologie der FU Berlin ange-
fertigt.

Tätigkeiten : 1. 4. 1971 Tutor am Institut für Tier-
bis physiologie der FU Berlin
30. 9. 1973
1. 9. 1973 Doktorand und freier Mitarbeiter
bis am Immunologischen Forschungslabor des
31. 3. 1976 Klinikums Steglitz der FU Berlin, Leiter
Prof. Dr. T. Diamantstein.
seit 1. 4. 1976 Wissenschaftlicher Mitarbeiter PDV am
Pharmazeutischen Institut der FU Berlin
bei Prof. Dr. H.R. Maurer.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30